



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MAICON FERNANDO PETRY DE PAULA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE
DOENÇAS BACTERIANAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO**

Londrina
2024

MAICON FERNANDO PETRY DE PAULA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE
DOENÇAS BACTERIANAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Balbi-Peña

Londrina
2024

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

M217p Paula, Maicon Fernando Petry de.
Prospecção de rizobactérias para o controle de doenças bacterianas e promoção do crescimento de tomateiro / Maicon Fernando Petry de Paula. - Londrina, 2024.
83 f.

Orientador: Maria Isabel Balbi Peña.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Biocontrole - Tese. 2. Pinta bacteriana - Tese. 3. Rizobactérias - Tese. 4. Tomateiro - Tese. I. Balbi Peña, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

MAICON FERNANDO PETRY DE PAULA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE
DOENÇAS BACTERIANASE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Balbi-Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Gabriela Machineski da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Rui Pereira Leite Junior
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná
IAPAR-EMATER

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a professora Maria Isabel Balbi Peña. Diante desta etapa final, de um processo que durou anos, me pego pensando em tudo o que sou grato a você e concluo que não é possível pontuar tudo neste pequeno tópico. Muito obrigado por tanto, sou grato por coisas que você fez por mim e que talvez você não tenha nem consciência de que tenha feito. Como te disse há dois anos e meio atrás, quando conclui minha graduação, você é uma das minhas inspirações e sempre me lembrarei de você com muito carinho.

Aos amigos que caminharam comigo durante esses últimos anos, obrigado Stephanie, Valdir, Gabriela, Aira e Julia. Gostaria de agradecer a toda a equipe do Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da UEL, sem nosso trabalho em equipe nada disso seria possível. Agradeço a banca examinadora, Dra. Gabriela Machineski da Silva e Dr. Rui Pereira Leite Junior que se dedicaram e contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido e finalizado.

Já no mestrado, o amadurecimento me proporcionou uma amizade mais sólida e, sem dúvidas, uma grata surpresa foi você Fernanda Neves Paduan. Muito obrigado por me acolher, aconselhar, conversar comigo em momentos bons e ruins e por estar tão presente ainda hoje.

Gostaria de agradecer minha amiga de infância. Amanda Baecker, sou muito grato por ter você em minha vida durante todo esse tempo e por todas as vezes que você me apoiou e disse que se sentia orgulhosa de mim. Eu também sinto muito orgulho de você. À minha avó Maria Aparecida Novaes e ao seu esposo Edson Francisco da Rocha que sempre estiveram tão presentes durante esta jornada. Obrigado por tanto.

Por fim, obrigado mãe. Tania Elisa Petry, nós dois sabemos de todos os detalhes destes quase 28 anos de história que temos juntos e sem dúvidas eu sou muito grato por todas as vezes que você foi capaz de seguir em frente, trabalhando arduamente e me apoiando para que eu chegasse a esse momento junto com você. Você também me inspira diariamente, pois é quase impossível me enxergar sem você, sem perceber tudo o que você fez por mim. Novamente, é difícil mensurar o quão grato sou, mas saiba que sem você nada disso seria real. Obrigado mãe.

“Mas hoje eu queria muito agradecer a mim. Porque eu não desisti.”

Anitta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação do tamanho do halo de inibição do teste de difusão em ágar por suspensão de células das bactérias antagonistas.....	27
Figura 2 – Avaliação do halo de inibição no teste de difusão em ágar do Sobrenadante Livre de Células (SLC) das bactérias antagonistas.....	28
Figura 3 – Caracterização dos halos de inibição observados no teste de cultura dupla com suspensão de células das rizobactérias antagonistas.....	37
Figura 4 – Número de isolados para cada nível de inibição contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (Xeu), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	37
Figura 5 – Halos de inibição observados no teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (Xeu).....	39
Figura 6 – Tamanho do halo de inibição do crescimento de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> em teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias antagonistas.....	39
Figura 7 – Halos de inibição observados no teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias contra <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs).....	40
Figura 8 – Tamanho do halo de inibição do crescimento de <i>Ralstonia solanacearum</i> em cultura dupla com SLC de rizobactérias antagonistas.....	40
Figura 9 – Halos de inibição do crescimento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> em teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias antagonistas....	41
Figura 10 – Halos de inibição observados no teste cultura dupla com SLC de rizobactérias contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm).....	41
Figura 11 – Halo transparente em torno da colônia de rizobactéria indicando solubilização de fosfato em meio GL.....	44
Figura 12 – Halo translúcido alaranjado em torno da colônia de rizobactéria indicando produção de sideróforos em meio Chrome Azurol S.....	44
Figura 13 – Concentração de Ácido-Indol-Acético (AIA) produzido por isolados de rizobactérias antagonistas cultivadas em meio Lúria-Bertani suplementado com 100 mg/L de L- triptofano.....	48
Figura 14 – Halos translúcidos indicando a atividade hemolítica (em meio ágar sangue), proteolítica (em meio contendo 1% de leite desnatado) e celulolítica (em meio mineral contendo celulose como única fonte de carbono) das rizobactérias antagonistas.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação, local de coleta e planta de origem dos isolados de rizobactérias.....	33
Tabela 2 – Halo de inibição do crescimento de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (Xeu), <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Pst), <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs) e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) em teste de cultura dupla com rizobactérias antagonistas.....	35
Tabela 3 – Produção de sideróforos em meio Chrome Azurol S e atividade solubilizadora de fosfato em meio GL por isolados de rizobactérias.....	42
Tabela 4 – Motilidade tipo swarming em meio ágar triptona de soja (0,75%) e formação de película na superfície de caldo triptona de soja.....	45
Tabela 5 – Atividade hemolítica (em meio ágar sangue), proteolítica (em meio contendo leite desnatado em pó 1%) e produção de celulases (em meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose) e glucanases (em meio com laminarina 0,5%) de rizobactérias.....	49
Tabela 6 – Número de lesões, severidade final (%) e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) (%) da pinta bacteriana em tomateiro tratado com rizobactérias.....	51
Tabela 7 – Germinação aos quatorze dias (%) e peso da matéria fresca (PMF) (g) de plântulas de tomateiro obtidas de sementes tratadas com suspensão de LAFUEL03, 43, 61, 66, 67, 71, 80 e 93.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido-Indol-Acético
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Rs	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SLC	Sobrenadante Livre de Células
UEL	Universidade Estadual de Londrina
Xeu	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	<i>CULTURA DO TOMATEIRO</i>	12
2.2	<i>DOENÇAS BACTERIANAS DO TOMATEIRO</i>	13
2.2.1	Mancha Bacteriana (<i>Xanthomonas</i> spp.)	13
2.2.2	Murcha Bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i>).....	14
2.2.3	Pinta Bacteriana (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>).....	15
2.2.3	Cancro Bacteriano (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>)....	15
2.3	<i>CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS NO TOMATEIRO</i>	16
2.4	<i>RIZOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS DO TOMATEIRO.....</i>	18
2.5	MECANISMOS DE AÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS.....	21
2.5.1	Produção de Metabólitos com Ação Antimicrobiana	21
2.5.2	Produção de Enzimas Líticas	22
2.5.2	Produção de Sideróforos	23
2.5.3	Produção de Ácido-Indol-Acético	23
2.5.4	Fixação de Nitrogênio e Solubilização de Fosfato.....	24
3	ARTIGO A	25
3.1	RESUMO	25
3.2	ABSTRACT.....	26
3.3	INTRODUÇÃO	27
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.4.1	Obtenção dos Isolados Bacterianos	28
3.4.3	Teste de Difusão em Ágar por Suspensão de Células Bacterianas	29
3.4.4	Obtenção do Sobrenadante Livre de Células (SLC) das Rizobactérias ...	30
3.4.5	Teste de Difusão em Ágar	31
3.4.6	Teste de Solubilização de Fosfato e Produção de Sideróforos	32
3.4.7	Motilidade Tipo <i>Swarming</i> e Formação de Película em Superfície.....	33
3.4.8	Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA)	33

3.4.9	Atividade hemolítica em meio ágar sangue e detecção de enzimas líticas	34
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.5.1	Coleta de amostras e isolamento de rizobactérias	35
3.5.2	Teste de cultura dupla por suspensão de células.....	37
3.5.3	Teste de antagonismo por Sobrenadante Livre de Células (SLC)	41
3.5.4	Teste de solubilização de fosfato e produção de sideróforos	45
3.5.4	Motilidade tipo <i>swarming</i> e formação de película em superfície	48
3.5.5	Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA)	50
3.5.6	Atividade hemolítica em meio ágar sangue e detecção de enzimas líticas	53
3.6	CONCLUSÃO.....	46
4	ARTIGO B.....	25
4.1	RESUMO	25
4.2	ABSTRACT	26
4.3	INTRODUÇÃO	27
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.4.1	Obtenção dos Isolados Bacterianas	28
4.4.2	Controle da Pinta Bacteriana em Tomateiro.....	28
4.4.3	Promoção de Crescimento em Tomateiro	29
4.4.4	Análise Estatística	35
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.5.1	Controle da Pinta Bacteriana em Plantas de Tomateiro	36
4.5.2	Promoção de Crescimento de Plântulas de Tomateiro	45
4.6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	687

DE PAULA, MAICON FERNANDO PETRY. **Prospecção de rizobactérias para o controle de doenças bacterianas e promoção do crescimento de tomateiro.** 2024. 83 folhas. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar e selecionar rizobactérias com potencial antagônico contra bactérias fitopatogênicas do tomateiro, caracterizá-las quanto a produção de enzimas líticas, sideróforos, biossurfactantes, ácido-indol-acético (AIA), solubilização de fosfato, motilidade tipo swarming e de formação de película. As bactérias foram isoladas a partir de amostras de raízes e solo rizosférico de plantas da família Solanaceae e, para obter apenas espécies esporulantes, as amostras foram submetidas a banho-maria a 85°C durante 15 minutos. Foi avaliada a inibição do crescimento das seguintes bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* com suspensão de células (SC) e com Sobrenadante Livre de Células (SLC) das rizobactérias isoladas. Também foi determinada a capacidade de produzir AIA por meio da quantificação colorimétrica com reagente de Salkowsky, de solubilizar fosfato em meio GL, a motilidade tipo swarming em meio Ágar Triptona de Soja (0,75%), de formar película em placas de fundo chato contendo caldo triptona de soja (TSB), de sintetizar biossurfactantes em meio ágar-sangue, de produzir enzimas líticas (celulase, glucanase, protease) e sideróforos em meio de cultura contendo Chrome Azurol S (CAS). Dentre os 66 isolados testados (63 isolados de rizobactérias obtidos no presente trabalho além de LAFUEL01, LAFUEL02 e LAFUEL03, que já pertenciam a coleção do laboratório de Fitopatologia da UEL), 46 isolados apresentaram algum grau de antagonismo contra as bactérias fitopatogênicas. O SLC apresentou efeito antagônico contra *X. euvesicatoria*, *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e nenhum efeito contra *P. syringae* pv. *tomato*. Cinquenta e nove isolados produziram sideróforos e 11 solubilizaram fosfato. Das 46 rizobactérias testadas, apenas sete não apresentaram atividade hemolítica, oito rizobactérias não apresentaram atividade celulolítica, nenhuma produziu glucanase e todas apresentaram atividade proteolítica. Foram selecionados alguns isolados com o objetivo de avaliar a eficiência de controle da pinta bacteriana em plantas inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato* e a capacidade de promover o crescimento em tomateiro. A aplicação de células dos isolados LAFUEL01 e LAFUEL40 diminuiu significativamente o número de lesões da pinta bacteriana em tomates inoculados com Pst demonstrando potencial na redução da doença. Nenhum isolado promoveu aumento da porcentagem de germinação e peso da matéria fresca de plântulas (aos 14 dias) oriundas de sementes microbiolizadas com as rizobactérias. Embora os isolados selecionados tenham apresentado capacidade de solubilizar fosfato e produzir AIA *in vitro*, não foi observada promoção de crescimento vegetal em plântulas aos 14 dias. O tempo de avaliação do crescimento de plântulas pode ter sido insuficiente para observar efeitos decorrentes da produção de AIA dos isolados bacterianos, os quais podem ser evidenciados em estádios fenológicos mais avançados.

Palavras-chave: Biocontrole, Pinta bacteriana, Promoção de crescimento,

Rizobactérias, Tomateiro.

DE PAULA, Maicon Fernando Petry. **Rhizobacteria prospecting to control bacterial diseases and promote tomato growth**. 2024. 83 p. Dissertation (Master in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and select rhizobacteria with antagonistic potential against phytopathogenic bacteria of tomato plants, and to characterize them regarding the production of lytic enzymes, siderophores, biosurfactants, indole acetic acid (IAA), phosphate solubilization, swarming motility and pellicle formation. To isolate only sporulating species, the bacteria were isolated from samples of roots and rhizosphere soil of plants of the Solanaceae family and the samples were subjected to a water bath at 85°C for 15 minutes. Growth inhibition tests were performed on *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with cell suspension (CS) and with cell-free supernatant (CFS) of the rhizobacteria. The ability to produce IAA by colorimetric quantification with Salkowsky reagent, to solubilize phosphate in GL medium, to demonstrate swarming motility in Tryptone Soy Agar (0.75%), to form a film on flat-bottom plates containing tryptone soy broth (TSB), to synthesize biosurfactants in blood agar medium, to produce lytic enzymes (cellulase, glucanase, protease) and siderophores in culture medium containing Chrome Azurol S (CAS) were also determined. Sixty-three rhizobacteria isolates were obtained, as well as the isolates LAFUEL01, LAFUEL02 and LAFUEL03, which already belonged to the collection of the Phytopathology Laboratory of UEL. Among the 66 isolates tested, 46 isolates showed some degree of antagonism against phytopathogenic bacteria. SLC showed antagonistic effects against *X. euvesicatoria*, *R. solanacearum* and *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and no effect against *P. syringae* pv. *tomato*. Fifty-nine isolates produced siderophores, and 11 solubilized phosphate. Of the 46 rhizobacteria tested, only seven did not show hemolytic activity, eight rhizobacteria did not show cellulolytic activity, none produced glucanases and all showed proteolytic activity. Some isolates were selected to evaluate the efficiency of bacterial spot control in plants inoculated with *P. syringae* pv. *tomato* and the ability to promote growth in tomato plants. The application of cells from isolates LAFUEL01 and LAFUEL40 significantly reduced the number of bacterial spot lesions in tomato plants inoculated with Pst, demonstrating potential in reducing the disease. No isolate promoted an increase in the germination percentage and fresh weight of seedlings (at 14 days) originating from seeds microbiolized with rhizobacteria. Although the selected isolates showed the ability to solubilize phosphate and produce IAA in vitro, no plant growth promotion was observed in seedlings at 14 days. The time of evaluation of seedling growth may have been insufficient to observe effects resulting from the production of IAA by the bacterial isolates, which may be more evident in more advanced phenological stages.

Key words: Bacterial spot, Biocontrol, Growth promotion, Rhizobacteria, Tomato.

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos dez maiores produtores de tomate no mundo. Já em escala global, a cultura é a segunda olerícola mais produzida ficando atrás apenas da batata. Tamanha importância se dá pela relevância econômica e nutricional que a solanácea tem para a sociedade.

Fungos, bactérias, vírus e nematoides podem causar prejuízos à produção da hortaliça. Com isso, estima-se que cerca de 30% de todo o custo de produção da cultura se deva a agrotóxicos empregados no controle de doenças.

Doenças bacterianas, de ocorrência nacional, como a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* spp., pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* são muito importantes pois afetam drasticamente a produtividade da cultura.

A mancha e a pinta bacteriana são altamente destrutivas, afetando o tecido foliar das plantas e se disseminando na lavoura, principalmente, através de respingos de água provenientes da chuva e irrigação. É necessária alta umidade relativa do ar e molhamento foliar para o desenvolvimento de ambas as doenças.

A murcha bacteriana afeta diversas espécies da família das solanáceas causando a murcha e a morte da planta. *Ralstonia solanacearum* é habitante do solo e, por isso, a irrigação por sulco, solo e material propagativo contaminado são os principais meios de disseminação.

O principal método de controle para a mancha e a pinta bacteriana é a utilização de cultivares resistentes, aliado ao controle químico com produtos cúpricos os quais são amplamente empregados no controle das duas doenças. Para a murcha bacteriana, nenhuma cultivar apresenta resistência e nenhum produto está registrado atualmente no Brasil para o controle da doença em tomateiro.

Embora eficazes para o controle de doenças bacterianas, produtos químicos à base de cobre na prática têm a sua eficiência reduzida pela ocorrência de chuva que retira o produto da superfície foliar e pela pressão de seleção de populações de bactérias resistentes. Assim, o controle biológico apresenta-se como uma alternativa para diminuir as populações de bactérias fitopatogênicas.

Os mecanismos pelos quais microrganismos antagonistas podem

eliminar ou diminuir populações de fitopatógenos são: antibiose, indução de resistência, competição, parasitismo e promoção de crescimento vegetal.

Entre os agentes de biocontrole, as rizobactérias têm grande destaque pois apresentam diversos mecanismos antagônicos e ainda são capazes de sobreviver em diversos ambientes, uma vez que produzem estruturas de sobrevivência denominadas endósporos. As rizobactérias são capazes de se associarem às raízes das plantas e promover o crescimento vegetal, melhorando a germinação e emergência de plântulas e até o crescimento de raízes e parte aérea. Esse efeito pode ocorrer devido à capacidade que as bactérias têm de fixar nitrogênio, solubilizar fósforo e produzir Ácido-Indol-Acético (AIA).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram: i) isolar e selecionar rizobactérias com potencial antagônico frente às bactérias *Xanthomonas euvesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agentes causais da mancha bacteriana, murcha bacteriana, pinta bacteriana e cancro bacteriano, respectivamente e ii) determinar a capacidade das rizobactérias de: produzir AIA, enzimas líticas, sideróforos e surfactantes, solubilizar fosfato, apresentar motilidade tipo *swarming* e formar película. Uma vez selecionados os isolados com antagonismo *in vitro* contra *P. syringae* pv. *tomato* e que apresentaram características positivas nos testes de caracterização, foram testados para o controle da pinta bacteriana em tomateiros artificialmente inoculados com *P. syringae* pv. *tomato*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO TOMATEIRO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à Família Solanaceae (ALVARENGA, 2013). A região andina é descrita como o centro de origem da cultura, embora, sua domesticação tenha se dado no México, de onde foi levado para países da Europa no século XVI (NAIKA et al., 2006).

De acordo com a Embrapa (2018), quatro grupos de tomate são destinados ao consumo *in natura*: Cereja, Santa Cruz, Italiano e Salada. O tomateiro pode ser cultivado em diversos sistemas de produção, levando em consideração fatores como: grupo, região, hábito de crescimento, demanda do mercado e renda do produtor (ALMEIDA et al., 2015).

O tomate é a segunda olericultura mais produzida no mundo, sendo o Brasil o nono produtor mundial. Em 2021 foram produzidos 189 milhões de toneladas de tomate no mundo com rendimento médio de 36,6 ton ha⁻¹ (FAOSTAT 2023). Em 2022, a produção de tomate no Brasil foi de 3,9 milhões de toneladas em área plantada de 54.161 hectares, com rendimento médio de aproximadamente 70 ton ha⁻¹. A produção da cultura foi a segunda maior dentre as olerícolas, ficando atrás apenas da batata inglesa com uma produção de 4 milhões de toneladas (IBGE, 2023). A importância da cultura para o Brasil é econômica, devido a cadeia produtiva que emprega milhares de pessoas (VILELA et al., 2012).

Devido a sua composição nutricional, o tomate destaca-se como uma fonte rica de vitaminas A e C, minerais e antioxidantes. Mesmo que as vitaminas estejam presentes em uma pequena proporção quando comparado a matéria seca total dos frutos, essas substâncias são importantes para a saúde humana (SILVA et al., 2006). Os pigmentos licopeno e β caroteno, presentes no tomate, são considerados antioxidantes importantes para uma dieta saudável (STEVENS, 2012). O licopeno confere efeitos preventivos contra doenças degenerativas, cardiovasculares e certos tipos de câncer. As principais fontes de licopeno na dieta humana são os produtos derivados do tomate, como molhos, extratos etc. (BOITEUX et al., 2012).

2.2 DOENÇAS BACTERIANAS DO TOMATEIRO

Na natureza, incluindo áreas de cultivo de tomate, há uma grande diversidade de espécies bacterianas, embora, quando consideramos apenas bactérias fitopatogênicas poucas espécies são efetivamente importantes e afetam negativamente a produtividade do tomateiro (REIS et al., 2021). As de ocorrência nacional são: mancha bacteriana (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*), pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), necrose da medula (*Pseudomonas corrugata*), murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) e podridão mole e talo oco (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.) (INOUE-NAGATA et al., 2016).

2.2.1 Mancha Bacteriana (*Xanthomonas* spp.)

A mancha bacteriana do tomateiro é causada por quatro espécies: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (INOUE-NAGATA et al., 2016). O gênero *Xanthomonas* pertence ao filo Proteobacteria, à classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadales e família Xanthomonadaceae (GARRITY; HOLT, 2000).

A mancha bacteriana pode provocar perdas de até 50% na produção e aumentar os custos devido ao controle da doença (INOUE-NAGATA et al., 2016).

As espécies causadoras da mancha bacteriana são disseminadas por sementes e mudas infectadas (SIMONTON et al., 2021). Em áreas já contaminadas, a bactéria pode sobreviver em restos culturais, em plantas daninhas e plantas voluntárias de tomateiro, que podem servir como fonte de inóculo entre uma safra e outra (ZAREI et al., 2018).

A mancha bacteriana é altamente destrutiva e de difícil controle em virtude da rápida disseminação da bactéria fitopatogênica, que penetra no tecido vegetal, principalmente por estômatos e ferimentos. A doença causa a destruição da área foliar de plantas de tomate, resultando na redução da capacidade fotossintética da planta e, conseqüentemente, da sua produtividade (NASCIMENTO et al., 2013).

Inoue-Nagata et al. (2016) descrevem os sintomas como lesões necróticas de coloração amarronzada que ocorrem em todos os tecidos aéreos. Nas

folhas, os sintomas se iniciam como manchas aquosas que se tornam necróticas. A desfolha prematura da planta de tomateiro expõe os frutos ao sol, causando sua escaldadura. Lesões nos tecidos foliares de plantas de tomate resultam na redução da capacidade fotossintética e, conseqüentemente, diminuem drasticamente sua produtividade (NASCIMENTO et al., 2013).

2.2.2 Murcha Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*)

A murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, é uma das principais doenças do tomateiro e de diversas outras solanáceas (HAYWARD, 1991). A doença foi relatada nas culturas da batata, tomate e berinjela nos Estados Unidos em 1896 por Erwin F. Smith (HAYWARD, 1994).

Ralstonia solanacearum é uma bactéria habitante do solo, gram-negativa, aeróbica, bastonetiforme, móvel por flagelos polares e não fluorescente (GARRATY et al., 2005). Em meio de cultura Kelman, isolados virulentos formam colônias de coloração esbranquiçadas e centro avermelhado, enquanto avirulentos apresentam coloração completamente vermelha (KELMAN, 1954).

Ralstonia solanacearum pertence ao Filo Proteobacteria, Classe β -proteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Burkholderiaceae (SMITH, 1986) (YABUUCHI et al., 1995). Embora, atualmente, pertença ao gênero *Ralstonia*, a bactéria já foi nomeada como *Bacillus solanacearum* (SMITH, 1896), *Pseudomonas solanacearum* (SMITH, 1914), *Burkholderia solanacearum* (YABUUCHI, 1992) e, somente, em 1995 passou ao gênero atual (YABUUCHI, 1995).

As plantas afetadas pela doença apresentam murcha foliar, inicialmente na porção apical da parte aérea e em horas mais quentes do dia, e com o progresso da doença toda a planta murcha e seca. Realizando um corte na base do caule, observa-se escurecimento dos vasos do xilema e, para confirmar a etiologia bacteriana do sintoma, é possível verificar um escorrimento leitoso por meio do teste do copo (INOUE-NAGATA et al., 2016).

De acordo com Quezado-Duval e Lopes (2012), a murcha é favorecida por alta temperatura e umidade do solo. Em áreas de cultivo com temperatura inferior a 18 °C, a doença apresenta baixo potencial destrutivo, mesmo que a bactéria esteja presente no solo.

2.2.3 Pinta Bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)

A pinta bacteriana, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, é uma doença do tomateiro que começou a causar grandes prejuízos no Brasil a produtores da solanácea a partir da década de 70 (MALAVOLTA; RODRIGUES NETO, 1991).

Pseudomonas syringae pv. *tomato* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica, móvel por um único flagelo polar, pertencente ao Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Pseudomonadales, Família Pseudomonadaceae. A bactéria sobrevive em sementes, em restos culturais de tomateiro que ainda não se decomposeram, plantas daninhas e plantas voluntárias de tomate (INOUE-NAGATA et al., 2016).

De acordo com Reis et al. (2021), a bactéria se dispersa, em curtas distâncias, por respingos de água de chuva ou irrigação, principalmente, com a ocorrência de ventos fortes durante o período de molhamento.

A doença afeta os órgãos aéreos da planta. Inicialmente, são observadas nas folhas manchas arredondadas de coloração marrom-escura, sendo que, em lesões mais velhas, comumente, a área necrótica é circundada por um halo amarelo. A doença apresenta grande ocorrência em regiões de temperaturas amenas (18-25°C) e alta umidade relativa do ar, acima de 90% (REIS et al., 2021).

2.2.3 Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

A bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* apresenta morfologia baciliforme, é gram-positiva e foi observada pela primeira no estado de Michigan, nos Estados Unidos da América no início do século 20. Enquanto no Brasil, o cancro bacteriano e sua etiologia foram constatadas apenas em 1956 (ZALUGA et al., 2013).

O cancro bacteriano já foi relatado em quase todas as áreas produtoras de tomate do mundo (CABI 2016). A ocorrência se deve a sua disseminação, altamente eficiente, por sementes contaminadas, que constituem a principal fonte de disseminação da bactéria a longas distâncias (MALAVOLTA et al., 2008).

Os sintomas da doença diferem em função das condições

ambientais, estirpe da bactéria, da cultivar de tomate e idade da planta infectada. O método de infecção também é determinante para caracterizar as lesões, pois quando a bactéria está presente em sementes ou se instala nos vasos do xilema, é transportada para outros órgãos da planta. Posteriormente, em condições de alta umidade, células bacterianas são produzidas nas lesões e são disseminadas pela água, causando infecções localizadas (INOUE-NAGATA et al., 2016).

A infecção pelo xilema (sistêmica) causa seca dos folíolos e queima da margem das folhas e pode ser constatada pelo escurecimento dos vasos adjacentes ao xilema quando observamos o caule. Infecções localizadas causam manchas no caule, folhas e frutos, chamado de “olho de passarinho” (LOPES, 2017).

2.3 CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS NO TOMATEIRO

O controle de doenças bacterianas é difícil e nenhuma técnica isolada de controle é totalmente eficaz, sendo requeridas várias medidas complementares.

O método de controle mais eficiente para as doenças bacterianas é a utilização de cultivares de tomateiro resistentes às doenças. Para a mancha e o cancro bacterianos existem cultivares com certo nível de resistência, enquanto para a pinta bacteriana existem cultivares resistentes, portadoras do gene *Pto* (INOUE-NAGATA et al., 2016). Para a murcha bacteriana a utilização de enxertia para obtenção de híbridos resistentes pode ser empregada, combinando híbridos comerciais, como: Spirit, Magnet, R601 e Guardião e Protetor (LOPES & MENDONÇA, 2014).

A utilização de sementes e mudas sadias, cultivo de tomateiro em regiões livre de bactérias fitopatogênicas, irrigação adequada, rotação de culturas, plantio em solos bem drenados e eliminação plantas doentes devem ser empregadas no controle de doenças bacterianas da cultura (REIS et al., 2021).

De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2023), atualmente, no Brasil são registrados 26 produtos que podem ser utilizados no controle da mancha bacteriana do tomateiro e três produtos registrados para a pinta bacteriana. Os produtos se dividem entre formulações a base de cobre e indutores de resistência. Para o controle da murcha bacteriana, causada por *R. solanacearum*, não há nenhum produto registrado no Brasil. Para o cancro bacteriano, são

registrados cerca de dez bactericidas a base de cobre para o controle da doença.

Com disponibilidade de apenas produtos à base de cobre, os produtores enfrentam problemas, já que o uso intensivo desses produtos pode favorecer populações resistentes ao cobre (Cu^{2+}). A eficiência de produtos cúpricos é altamente dependente do clima, uma vez que a ocorrência de chuva logo após a sua aplicação pode retirar ou diminuir a concentração de ingrediente ativo que está em contato com a planta. Há também uma preocupação ambiental no uso excessivo de compostos à base de cobre que podem levar ao acúmulo de altos teores de cobre nos solos (PERNEZNY et al., 2012; INOUE-NAGATA et al., 2016).

A partir do início dos anos 1990, o uso de agrotóxicos no Brasil cresceu significativamente. De acordo com o IBAMA (2022), entre 2010 e 2020 houve um acréscimo de 78,3% na comercialização de agrotóxicos no Brasil, passando de 384,5 mil toneladas para 685,7 mil toneladas, respectivamente.

Estudos realizados por Andrade et al. (2013) verificaram que os consumidores estão preocupando-se com os riscos relacionados à contaminação de alimentos, uma vez que os impactos dos agrotóxicos só podem ser diagnosticados a longo prazo, gerando insegurança na aquisição e consumo dos alimentos.

Há uma mudança na atitude das pessoas em relação aos fertilizantes e pesticidas de base química devido aos perigos emergentes da poluição ambiental e aos efeitos residuais dos pesticidas na saúde humana e também no ecossistema terrestre. Como resultado, foram impostas leis e regulamentos rigorosos para o uso seguro de agroquímicos. Consequentemente, o desenvolvimento de produtos biológicos é de extrema importância para ampliar os produtos de controle como alternativa aos agroquímicos sintéticos.

Segundo Cook e Baker (1983), o controle biológico pode ser definido como a redução do inóculo ou das atividades determinantes de um fitopatógeno por um ou mais microrganismos. Ou ainda, a destruição parcial ou total de populações de fitopatógenos por outros microrganismos encontrados na natureza (AGRIOS, 2005).

Os mecanismos de interação antagônicos pelos quais microrganismos podem atuar são: a produção de metabolitos com ação antimicrobiana (antibiose), indução de resistência em plantas, competição, parasitismo, predação e promoção de crescimento (MEDEIROS et al., 2019).

Existem numerosos estudos que visam determinar o efeito de microrganismos antagonistas sobre fitopatógenos. Konappa et al. (2018) isolaram *Trichoderma asperellum* da rizosfera de plantas de tomateiro e determinaram que o fungo reduziu a incidência da murcha bacteriana no tomateiro de 85% no tratamento controle para 40% no tratamento utilizando *T. asperellum*. Os autores ainda observaram um aumento de produtividade nas parcelas onde o fungo foi utilizado.

Yoo et al. (2018) determinaram que o isolado JF27 de *Aspergillus terreus* reduziu a infestação de células de *P. syringae* pv. *tomato* no tecido das folhas de tomateiro, em comparação com o tratamento controle. Enquanto no tratamento controle a população de *P. syringae* pv. *tomato* era 10^8 UFC/cm², o isolado antagonista JF27 promoveu redução da população da bactéria patogênica ao nível de 10^2 UFC/cm². O fungo antagonista também foi capaz de promover o crescimento de plantas de tomateiro.

Ling et al. (2020), buscando isolar actinobactérias do solo antagonistas a *R. solanacearum*, determinaram que as células de NEAU-HV9 de *Streptomyces* sp. e o metabólito Actinomycin D, produzido pela mesma, tiveram 100% de eficiência no controle da murcha em plântulas de tomateiro.

Konappa et al. (2020) testaram 18 isolados de rizobactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Brevi bacillus* e *Pseudomonas* em ensaios para induzir a resistência de plantas de tomateiro contra a murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*. A incidência de murcha bacteriana em plantas provenientes de sementes tratadas com células dos isolados Pf3 (*P. fluorescens*) e IN937a (*B. amyloliquefaciens*) foi de 54%, enquanto em plantas provenientes de sementes tratadas com água foi de 97%.

2.4 RIZOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS DO TOMATEIRO

Rizobactérias são microrganismos que podem estabelecer relações de simbiose e vida livre na superfície das raízes das plantas. Dentre os gêneros amplamente encontrados na rizosfera estão: *Pseudomonas* spp., *Azospirillum* spp.; *Serratia* spp., *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp, e *Bacillus* spp. (MELO, 2021).

Espécies do gênero *Bacillus* e gêneros relacionados são designadas coletivamente como bactérias formadoras de endósporos aeróbicos (AEFB). Dentro

do filo Firmicutes, essas espécies são alocadas na classe Bacilli, ordem Bacillales que contém sete de dez famílias que abrigam formadores de endósporos: Alicyclobacillaceae, Bacillaceae, Paenibacillaceae, Pasteuriaceae, Planococcaceae, Sporolactobacillaceae e Thermoactinomycetaceae (MARTINS, et al., 2020). Dessa forma, as espécies alocadas no gênero *Bacillus* e gêneros relacionados, da mesma família ou de famílias diferentes, são denominadas coletivamente AEFB (OREM et al., 2019).

Bactérias do gênero *Bacillus* pertencem à classe Bacilli, ordem Bacillales e família Bacillaceae (GALPERIN, 2013). São bactérias gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas. A importância do gênero se dá uma vez que esses microrganismos podem produzir substâncias relevantes para estudos biotecnológicos, como enzimas amilolíticas, proteolíticas e antimicrobianas (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017). Por apresentarem a capacidade de produzir endósporos, essas bactérias são capazes de sobreviver em diversos ambientes e nichos ecológicos (LANNA FILHO et al., 2010).

Le et al. (2020) determinaram que o caldo fermentado proveniente do isolado JCK-5075 de *Paenibacillus elgii* quando aplicado em plantas de tomateiro suprimiu em 81% a incidência da murcha bacteriana. Em comparação, o tratamento com antibiótico comercial reduziu 86% da incidência, e foram considerados igualmente eficientes para o controle da murcha bacteriana em tomateiro.

Im et al. (2020) identificaram que o isolado DR-08 de *Bacillus methylotrophicus* controlou a murcha bacteriana em plantas de tomateiro. O produto fermentado proveniente do cultivo da bactéria, diluído 250 vezes, controlou 90% da doença em relação ao controle, enquanto, o antibiótico comercial controlou 56%. Os autores ainda determinaram que a bactéria produz substâncias como a oxidificidina e difficidina, e atribuíram sua capacidade antagônica a estes compostos.

Felipe et al. (2021) verificaram que o tratamento foliar utilizando o sobrenadante livre de células dos isolados VMA11p, VM05 ou VMAP1 de rizobactérias do gênero *Bacillus* reduziu a severidade da mancha bacteriana em 98, 94 e 75%, respectivamente. O tratamento reduziu significativamente o número de lesões por folíolo em comparação com o controle.

Bertoglio et al. (2023) testaram a pulverização de produtos à base de células e metabólitos do isolado LABIM17 de *B. brevis* em folhas de tomateiro e observaram que as plantas tratadas com a rizobactéria apresentaram os menores

valores de AACPD, aproximadamente 9 na concentração de $3,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, em comparação com o tratamento água, com aproximadamente 23.

Zhang et al. (2019) determinaram que o isolado BR3 de *Bacillus* sp. inibiu a expressão do gene *gacS* de *P. syringae* pv. *tomato*. Além disso, o extrato de BR3 reduziu o nível de proteína GacS e prejudicou a expressão dependente de GacA de pequenos RNAs, a motilidade e a resposta de hipersensibilidade (HR) desencadeada por *P. syringae* pv. *tomato*. O sistema GacS/GacA e seus homólogos desempenham papel importante na coordenação da expressão de fatores de virulência necessários para a infecção bem-sucedida de muitas bactérias gram negativas patogênicas de plantas e animais. Os resultados deste trabalho sugerem que o extrato do isolado BR3 pode oferecer um método alternativo para controlar doenças bacterianas em plantas visando o sistema GacS/GacA.

Além de apresentar antagonismo a patógenos, rizobactérias do gênero *Bacillus* são capazes de promover o crescimento vegetal. A promoção pode ocorrer através da fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fósforo, produção de Ácido-Indol-Acético, produção de sideróforos e oxidação de enxofre (TORTORA et al., 2011). Essas bactérias trazem melhorias na germinação de sementes, emergência de plântulas, crescimento de raiz e parte aérea (FIGUEREDO et al., 2010).

Dhouib et al. (2019) determinaram que o tratamento do solo com suspensão de células do isolado C2 de *Bacillus velezensis* promoveu alongamento do caule e aumento no número de folhas emitidas em plantas de tomateiro. A bactéria foi capaz de aumentar o tamanho do caule de 5,37 cm para 8,7 cm.

Choi et al. (2019) verificaram os isolados KYC de *B. thuringiensis* e CE 100 de *B. velezensis* apresentaram efeito de promoção de crescimento em tomateiro. A aplicação de células das bactérias no substrato aumentou o peso das plantas de 25 g no controle para 35 g com o isolado KYC e 32 g com o CE 100, aproximadamente.

Masood et al. (2020) ao embeberem raízes de tomateiro com suspensão de células de *B. pumilus* determinaram que a inoculação aliada à adubação nitrogenada aumentou em 8% o teor de clorofila foliar, 16% a altura das plantas, 27% o peso fresco da parte aérea e 35% o peso seco da parte aérea em comparação com plantas não inoculadas e que receberam a adubação.

2.5 MECANISMOS DE AÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS.

2.5.1 Produção de Metabólitos com Ação Antimicrobiana

A atividade antagônica de rizobactérias, como *Bacillus* spp. e gêneros relacionados estão associadas à produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas. Esses compostos envolvem principalmente peptídeos de baixo peso molecular que são gerados ribossomalmente (bacteriocinas) ou não ribossomalmente (lipopeptídeos, peptídeos, policetídeos) (MILJAKOVIĆ et al., 2020).

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomalmente que atuam contra as células-alvo, interferindo na síntese da parede celular ou formando poros na membrana celular. Os mecanismos antimicrobianos das bacteriocinas são geralmente direcionados contra as espécies que são as mesmas ou intimamente relacionadas aos produtores, com um espectro de ação estreito, tendo, portanto, um uso importante no controle biológico de bactérias patogênicas. Algumas das bacteriocinas e substâncias semelhantes à bacteriocina já reportadas de vários *Bacillus* spp. incluem amilolisina, amisina, subtilina, subtilosina A, subtilosina B e turicina (MILJAKOVIĆ et al., 2020). As bacteriocinas exibem pesos moleculares, propriedades bioquímicas, espectros inibitórios e mecanismos de ação variáveis (SINGH et al., 2019).

Os lipopeptídeos cíclicos são bem conhecidos por sua ação antagônica contra uma ampla gama de patógenos de plantas, sendo os compostos antibióticos mais estudados em *Bacillus* spp. A capacidade antagônica contra fitopatógenos geralmente se dá pela interação com a membrana celular dos patógenos-alvo, causando alterações em sua estrutura e permeabilidade por rompimento, solubilização ou formação de poros condutores de íons (SHAFI et al., 2017; MILJAKOVIĆ et al., 2020).

Os lipopeptídeos cíclicos mais importantes de *Bacillus* spp. são representados pelas famílias surfactina, iturina e fengicina. A família das surfactinas (surfactina, lichenysin, pumilacidin, halobacilin, bamilocyn) atuam como agentes antifúngicos e antibacterianos. A família das iturinas (iturina, micosubtilina, bacilomicina, bacilopeptinas, mixirinas, mojavensina, subtilene) exibem efeitos inibitórios em uma ampla gama de fungos, mas são menos ativas contra bactérias. A família das fengicinas (fengicina, plipastatina, maltacin) são úteis na proteção de

plantas contra patógenos fúngicos (MILJAKOVIĆ et al., 2020).

Outros lipopeptídeos não sintetizados por ribossomos e incluem kurstakinas, bacitracinas, polimixinas, gramicidinas e tirocidinas. As kurstakinas têm capacidade de desestabilizar membranas biológicas tanto de bactérias quanto de fungos, as bacitracinas têm atividade dirigida principalmente contra bactérias Gram-positivas, as polimixinas são decapeptídeos cíclicos produzidos por *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*), que inibem células bacterianas Gram-negativas e as gramicidinas e tirocidinas são produzidos por *Bacillus brevis*, ativos contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Diversas espécies de *Bacillus* são conhecidas por produzirem outros antibióticos não sintetizados ribossomalmente, como peptídeos (bacilisina, rizotocina, amicoumacina, micobacilina, dicetopiperazinas) e policetídeos (bacilaeno, dihidrobacilina, difficidina, macrolactina), com diversas atividades antifúngicas e antibacterianas (MILJAKOVIĆ et al., 2020).

2.5.2 Produção de Enzimas Líticas

A atividade antimicrobiana de rizobactérias também pode ser devida à produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases, quitosanases, glucanases, celulasas, lipases e proteases, que hidrolisam eficientemente os principais componentes das paredes celulares de fungos e bactérias. Quitinases são hidrolases glicosídicas que degradam as ligações β -1,4-glicosídicas na quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante naturalmente disponível depois da celulose, e o principal componente da parede celular fúngica (RATHORE; GUPTA, 2015) sendo potenciais agentes de controle biológico contra uma variedade de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. Quitosanases catalisam a degradação hidrolítica das ligações β -1,4-glicosídicas no derivado de quitina-quitosana (WEIKERT et al., 2017). As glucanases hidrolisam ligações glicosídicas presentes em α -glucanos e β -glucanos. O β -1,3-glucano é o segundo maior componente da parede celular fúngica depois da quitina. α -1,3-glucanase e β -1,3-glucanase já foram isoladas de *Bacillus brevis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans* e *Bacillus halodurans* (PLANAS, 2000). Além da quitina e da glucana, as paredes celulares dos fungos contêm celulose, lipídios e proteínas e, portanto, as celulasas, lipases e proteases bacterianas podem desempenhar um papel significativo na lise da parede

celular fúngica (GULERIA et al., 2016). O potencial de *B. amyloliquefaciens* para o biocontrole de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* foi atribuído à produção de enzimas líticas (celulase, lipase, protease e quitinase (GAUTAM et al., 2019).

2.5.2 Produção de Sideróforos

O ferro é um elemento essencial para diferentes processos biológicos, como metabolismo do oxigênio, síntese de DNA e RNA, transferência de elétrons e processos enzimáticos, mas não é um nutriente livremente disponível. Em resposta a essa deficiência de ferro, um dos mecanismos de aquisição de ferro microbiano é a produção e secreção de sideróforos. Os sideróforos atuam como agentes solubilizantes extracelulares de ferro a partir de minerais ou compostos orgânicos em condições de limitação de ferro. A importância dos sideróforos no controle biológico baseia-se na complexação do ferro tornando-o menos disponível para fitopatógenos que geralmente não são capazes de produzir sistemas de transporte de ferro (SINGH et al, 2019).

2.5.3 Produção de Ácido-Indol-Acético

Espécies de *Bacillus* podem ser caracterizadas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, pois são capazes de colonizar os tecidos radiculares e a rizosfera e sintetizar fitormônios como o Ácido-Indol-Acético (AIA) (ZEILINGER, 2016).

O AIA pertence à classe das auxinas e é considerado uma molécula de sinalização essencial que atua na regulação do crescimento vegetal (MATSUDA et al., 2018). A maior parte das rizobactérias estudadas são capazes de sintetizar AIA e, com isso, elevam os níveis de auxina nos tecidos vegetais melhorando o crescimento da planta (IQBAL et al., 2018).

A promoção de crescimento das espécies vegetais através deste fitohormônio é gerada pelo estímulo da divisão celular dos tecidos vegetais, desde sua diferenciação até a formação do tecido, levando ao aumento na formação de raízes e, conseqüentemente, aumento de absorção de água e nutrientes (DUCA et al., 2014). Segundo Spaepen et al. (2007), a síntese de AIA por um microrganismo

ocorre por diferentes rotas metabólicas: indol-3-acetamida, indol-3-piruvato, indol-3-acetonitrila, cadeia lateral do triptofano-oxidase e triptamina.

2.5.4 Fixação de Nitrogênio e Solubilização de Fosfato

Rizobactérias podem promover o crescimento de plantas através da fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de fósforo (TORTORA et al., 2010). Segundo Olanrewaju et al. (2017), as rizobactérias produzem enzimas, como as fosfatases ácidas e ácidos orgânicos, que são capazes de romper as ligações entre moléculas de fósforo e compostos como ferro, alumínio e matéria orgânica, tornando-o disponível para a planta. A fixação de nitrogênio é responsável por contribuir com 65% de todo o nitrogênio absorvido por uma planta, tal contribuição só é possível através do processo conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (ELSER et al., 2007). As bactérias fixadoras de nitrogênio produzem enzimas como a nitrogenase, que rompe a tripla ligação presente na molécula de nitrogênio atmosférico, convertendo N_2 em NH_3 (SARITA et al., 2008; SANTI et al., 2013).

3 ARTIGO A

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO *in vitro* DE RIZOBACTERIAS VISANDO O ANTAGONISMO A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS DO TOMATEIRO E A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

3.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar rizobactérias e caracterizar *in vitro* o potencial antagônico contra bactérias fitopatogênicas do tomateiro e de promoção de crescimento de plantas. As rizobactérias foram isoladas a partir de amostras de raízes e solo rizosférico de plantas da família Solanaceae e, para obter apenas espécies esporulantes, as amostras foram submetidas a banho-maria a 85°C durante 15 minutos. Foram realizados testes de cultura dupla contra *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* com suspensão de células (SC) e com Sobrenadante Livre de Células (SLC) das rizobactérias. Também foi determinada a capacidade de produzir AIA por meio da quantificação colorimétrica com reagente de Salkowsky, de solubilizar fosfato em meio GL, a motilidade tipo swarming em meio Ágar Triptona de Soja (0,75%), de formar película em placas de fundo chato contendo caldo triptona de soja (TSB), de sintetizar biossurfactantes em meio ágar-sangue, de produzir enzimas líticas (celulase, glucanase, protease) e sideróforos em meio de cultura contendo Chrome Azurol S (CAS). A partir dos 66 isolados testados (63 rizobactérias, obtidas a partir do isolamento realizado no presente trabalho, além de LAFUEL01, LAFUEL02 e LAFUEL03, que já pertenciam a coleção do laboratório de Fitopatologia da UEL), foi identificado que 46 bactérias apresentaram antagonismo contra as bactérias fitopatogênicas. O SLC apresentou efeito antagônico contra *X. euvesicatoria*, *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e nenhum efeito contra *P. syringae* pv. *tomato*. Cinquenta e nove isolados produziram sideróforos, 11 rizobactérias solubilizaram fosfato. Das 46 rizobactérias selecionadas com base nos testes anteriores, todas apresentaram atividade proteolítica, apenas oito rizobactérias não apresentaram atividade celulolítica, sete não apresentaram atividade hemolítica e nenhuma produziu glucanase. Concluímos que grande parte dos isolados apresenta características desejáveis para ser utilizada no biocontrole de doenças causadas por bactérias e na promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: Antagonismo, Biocontrole, Rizobactérias, Tomateiro.

3.2 ABSTRACT

The aim of this study was to isolate rhizobacteria and characterize in vitro their antagonistic potential against phytopathogenic bacteria of tomato plants and their growth promotion potential. To obtain only sporulating species, rhizobacteria were isolated from samples of roots and rhizosphere soil of plants of the Solanaceae family and subjected to a water bath at 85°C for 15 minutes. Double culture tests were performed against *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with cell suspension (CS) and with cell-free supernatant (CFS) of rhizobacteria. The ability to produce IAA by colorimetric quantification with Salkowsky reagent, to solubilize phosphate in GL medium, to demonstrate swarming motility in Tryptone Soy Agar (0.75%), to form a film on flat-bottom plates containing tryptone soy broth (TSB), to synthesize biosurfactants in blood agar medium, to produce lytic enzymes (cellulase, glucanase, protease) and siderophores in culture medium containing Chrome Azurol S (CAS) was also determined. Sixty-three rhizobacteria isolates were obtained and deposited in the collection with isolates LAFUEL01, LAFUEL02 and LAFUEL03. In a double culture test, thirty-nine isolates showed some degree of antagonism against phytopathogenic bacteria. SLC showed an antagonistic effect against *X. euvesicatoria*, *R. solanacearum* and *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and no effect against *P. syringae* pv. *tomato*. Fifty-nine isolates produced siderophores, 11 rhizobacteria solubilized phosphate. Of the 46 rhizobacteria selected based on the previous tests, all presented proteolytic activity, only eight rhizobacteria did not present cellulolytic activity, seven did not present hemolytic activity and none produced glucanases. We conclude that most of the isolates have positive characteristics for use in biocontrol and plant growth promotion.

Key words: Biocontrol, Growth promotion, Rhizobacteria, Tomato.

3.3 INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização de rizobactérias é uma estratégia fundamental para o controle de doenças e promoção de crescimento de plantas. Isso se deve a diversas características que este grupo de microrganismos apresentam, como produção de compostos com ação antimicrobianas (RAO et al., 2016), capacidade de formar endósporos que permite que rizobactérias do gênero *Bacillus* sobrevivam a condições ambientais diversas (ALOO et al., 2019), suplementação de nutrientes como fósforo e nitrogênio para as plantas (CARDOSO & ANDREOTE, 2016) e produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal como auxinas e giberelinas (VEJAN et al., 2016).

As bactérias associadas as raízes das plantas também são capazes de produzir enzimas das classes das proteases, pectinases, celulasas, glucanases e podem ser utilizadas em diversos setores industriais e, principalmente, no controle de fitopatógenos (DOS SANTOS et al., 2018).

As rizobactérias já foram descritas como agentes antagonistas contra *Sclerotinia sclerotiorum* (PINHO et al., 2020), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (VANEGAS et al., 2020), *Rhizoctonia solani* (TEIXEIRA et al., 2021), *Xanthomonas euvesicatoria* (BERTOGLIO et al., 2023) e *Ralstonia solanacearum* (HOSSAIN et al., 2021; SALEIM et al., 2024). Também é descrita a capacidade de formar biofilme, que associada as demais características, tem sido considerada fundamental para agentes de biocontrole (FAN et al., 2011).

Os objetivos deste estudo foram isolar e selecionar rizobactérias com potencial antagônico frente a bactérias que causam doenças em tomateiro: *Xanthomonas euvesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Caracterizar os isolados quanto a produção de Ácido-Indol-Acético (AIA), enzimas líticas, sideróforos, biosurfactantes, motilidade tipo *swarming*, capacidade de solubilizar de fosfato e de formar película.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Obtenção dos Isolados Bacterianos

Foram realizadas prospecções de rizobactérias em áreas do Campus e da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina – UEL (latitude: -23 20' 23,17, longitude: -51 12' 32,11 e 610 m de altitude). Dez amostras de raízes de plantas da família Solanaceae e de solo associada a rizosfera (até 10 cm de profundidade) foram coletadas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e em seguida foi realizado o processo de isolamento.

Para obtenção dos isolados bacterianos, foram preparadas suspensões a partir de 10 g de solo e tecido radicular macerados em 90 mL de água destilada esterilizada. As amostras foram agitadas a 200 rpm durante 15 minutos e diluídas até a concentração de 10^{-3} . Para isolar apenas bactérias esporulantes, característica presente em bactérias do gênero *Bacillus* e gêneros relacionados, as amostras foram submetidas a banho-maria a 85°C durante 15 minutos. Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em meio Ágar-Nutriente (AN) (28 g AN comercial; 1000 mL água destilada). Os isolamentos foram realizados em triplicata e as colônias bacterianas foram selecionadas de acordo com sua morfologia e, posteriormente, estriadas em placas contendo meio AN para obtenção de colônias puras.

Os isolados LAFUEL01, LAFUEL02 e LAFUEL03 foram obtidos como contaminantes em testes de confronto direto entre fungos fitopatogênicos e leveduras no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em março de 2020. Os três isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*. O genoma de LAFUEL03 foi sequenciado e identificado como *B. velezensis* (DUIN, 2022).

As bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas euvesicatoria* 75-3 IAPAR, *Ralstonia solanacearum* 10407 IAPAR, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 7716 IAPAR e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4704 IAPAR são provenientes da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia e Diagnóstico em Fitossanidade do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR/Emater) em Londrina/PR. Para uso nos experimentos, os isolados foram ativados em meio AN e incubados a 28 ± 2 °C por 24 horas.

3.4.2 Preservação dos Isolados Bacterianos

A preservação das bactérias foi realizada pelo método de secagem (ROMEIRO, 2001). As bactérias foram cultivadas em meio AN durante 24h e suspensas em solução salina estéril. Em erlrmeyer, foram adicionados 5 mL da suspensão de células bacterianas e 5 mL de meio peptona-gelatina (50 g L⁻¹ gelatina, 80 g L⁻¹ peptona). Em seguida, tiras de papel-filtro foram embebidas com a suspensão. As tiras de papel-filtro foram transferidas para placas de Petri e acondicionadas em dessecador, contendo sílica-gel, durante cinco dias. As tiras foram armazenadas em envelopes estéreis a 4 °C.

3.4.3 Teste de Difusão em Ágar por Suspensão de Células Bacterianas

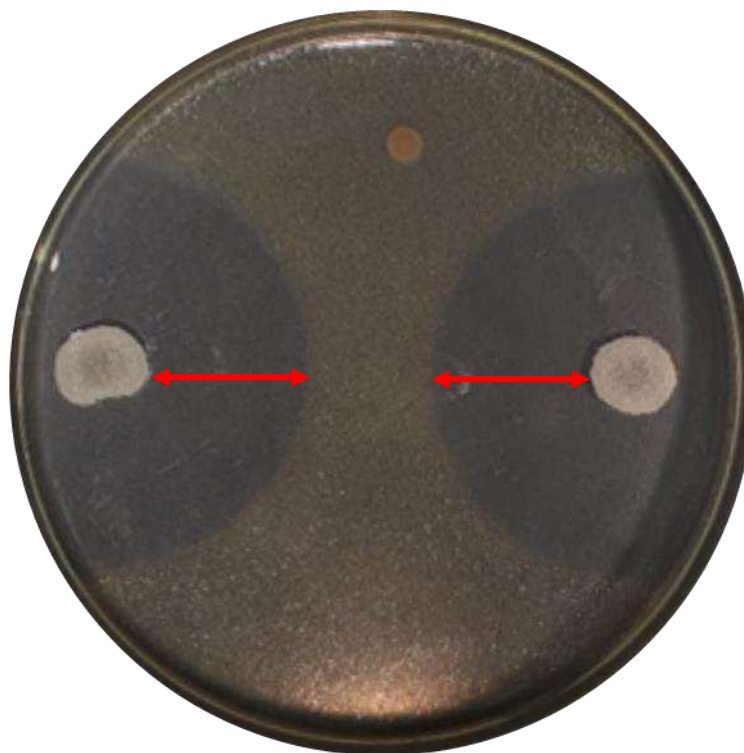
A seleção das rizobactérias com potencial antagônico foi realizada pela difusão dos metabólitos em ágar em teste de cultura dupla contra as bactérias fitopatogênicas. As bactérias fitopatogênicas, *X. euvesicatoria*, *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *tomato* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foram ativadas em meio AN a 28°C durante 24h e, posteriormente, foram preparadas suspensões de células em água (SC), ajustadas em espectrofotômetro para densidade óptica de 600 nm igual a 0,3 (O.D.₆₀₀ = 0,3). Alíquotas das suspensões das bactérias fitopatogênicas foram incorporadas em meio NA fundente a 0,25% v/v (pour plate). Após a solidificação do meio inoculado com as bactérias fitopatógenas, alíquotas de 10 µL das suspensões das rizobactérias foram inoculadas em dois pontos da placa de Petri. As culturas foram incubadas a 28°C e a observação de halo sem crescimento das bactérias fitopatogênicas em torno da colônia das rizobactérias indicou a inibição do crescimento.

As avaliações foram realizadas após 48 e 96h de incubação. Foi realizada análise semi-qualitativa, medindo o tamanho do halo de inibição a partir da borda da colônia da rizobactéria (Figura 1). O potencial antagônico foi classificado como: (-) sem halo ou ausência de efeito antagônico; (+) pequeno halo de até 2 mm ou pouco efeito; (++) halo médio de 3 a 5 mm ou atividade mediana; (+++) halo grande de 6 a 10 mm ou atividade alta; (+++++) halo muito grande ou atividade antagônica muito alta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a unidade experimental foi constituída por uma placa com duas colônias de

rizobactéria, sendo uma colônia uma repetição, totalizando seis repetições, três placas de Petri por isolado.

Figura 1 – Avaliação do tamanho do halo de inibição do teste de difusão em ágar por suspensão de células das bactérias antagonistas.



Fonte: Próprio autor (2024).

3.4.4 Obtenção do Sobrenadante Livre de Células (SLC) das Bactérias Antagonistas

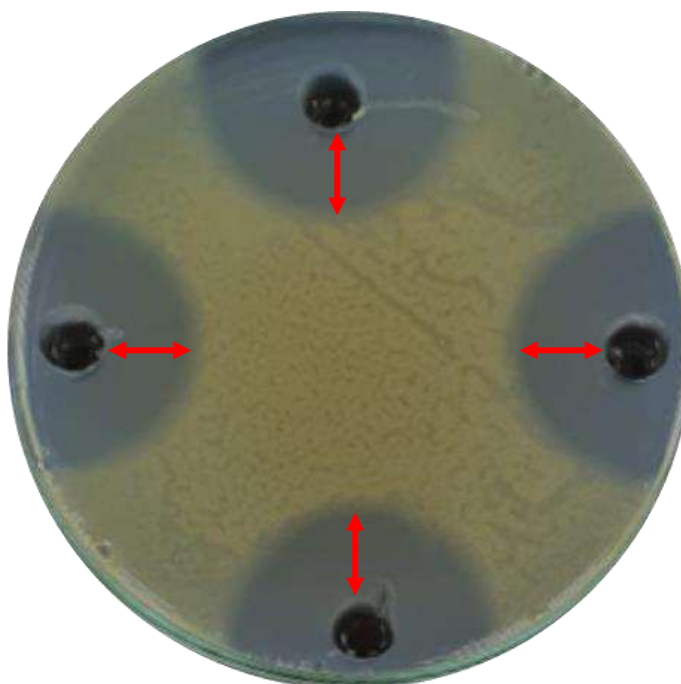
Os isolados de rizobactérias que apresentaram os melhores resultados no teste de difusão em ágar por suspensão de células bacterianas foram selecionadas para o teste com SLC. Para produção do SLC, os isolados bacterianos foram ativados em meio AN a 28 °C durante 24 h e suas células foram suspensas em água ($O.D._{600} = 0,3$). Para obtenção do inóculo, 40 μ L dessa suspensão foram acrescentados em 40 mL de caldo Luria Bertani (LB) e mantido em agitação de 190 rpm, a 28 °C durante 24h. Após a incubação, alíquotas do inóculo foram adicionadas em 125 mL de caldo LB (1% v/v) e mantido em agitação de 200 rpm a 28 °C durante 72h. Para obtenção do SLC, a cultura foi centrifugada duas vezes a 4.000 rpm durante 10 min e, posteriormente, filtrada em membrana de celulose com poros de 0,22 μ m de diâmetro.

3.4.5 Teste de Difusão em Ágar

As bactérias fitopatogênicas *X. euvesicatoria*, *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *tomato* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foram ativadas em meio AN a 28 °C por 24h e suas células foram suspensas em água (O.D.₆₀₀ = 0,3). Alíquotas das suspensões foram incorporadas em meio na fundente a 0,25% v/v (pour plate). Após a solidificação do meio inoculado, duzentos microlitros do SLC foram adicionados em cada um dos quatro poços perfurados de forma equidistante no meio AN na placa de Petri. As culturas foram incubadas a 28°C durante 48h e, posteriormente, foi mensurado o tamanho do halo de inibição a partir da borda do poço com SLC (Figura 2).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a unidade experimental foi constituída por uma placa com quatro poços, sendo cada poço uma repetição, totalizando oito repetições (duas placas por SLC). Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 2 – Avaliação do halo de inibição no teste de difusão em ágar do Sobrenadante Livre de Células (SLC) das bactérias antagonistas.



Fonte: Próprio autor (2024).

3.4.6 Teste de Solubilização de Fosfato e Produção de Sideróforos

A capacidade de solubilizar fosfato dos isolados de rizobactérias foi determinada qualitativamente em meio GL (KATZNELSON, BOSE, 1959). Para obtenção do meio GL três frascos contendo: frasco I - 5 g L⁻¹ glicose, 1 g L⁻¹ extrato de levedura e 15 g L⁻¹ ágar; frasco II – 50 mL fosfato dipotássico (10%); frasco III – 100 mL de solução de cloreto de cálcio (10%). Os frascos foram submetidos à autoclavagem e, posteriormente, o conteúdo foi resfriado a 50 °C. O conteúdo dos frascos II e III foi adicionado ao frasco I, precipitando CaHPO₄. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

As rizobactérias foram cultivadas em meio GL e incubadas a 28 °C durante 3 dias. A observação de halo claro em torno da colônia bacteriana indicou a atividade de solubilização de fosfato. A atividade solubilizadora foi classificada como: (-) sem halo ou falta de atividade; (+) presença de halo de inibição ou atividade solubilizadora.

A produção de sideróforos foi realizada em meio de cultura contendo Chrome Azurol S (CAS). Para obtenção do meio de cultura, quatro soluções contendo: I – 60,5 mg de CAS e 50 mL de água deionizada; II – 10 mL de solução de FeCl₃ 6H₂O 1 mM e HCl 10 mM; III – 72,9 mg de hexadecyl trimethyl ammoniumbromide (HDTMA) e 40 mL de água deionizada; IV – meio de cultura TSB (20% da dose comercial recomendada), 15 g L⁻¹ ágar e 900 mL de água deionizada foram autoclavadas separadamente. Sob constante agitação, o conteúdo do frasco I foi adicionado ao II e a mistura foi acrescentada ao meio de cultura, em seguida a solução III também foi adicionada ao frasco contendo meio de cultura e as demais soluções.

As culturas foram inoculadas com os isolados bacterianos e as culturas incubadas no escuro a 28°C por 3 dias. O desenvolvimento de halo translúcido alaranjado em torno da colônia indicou a produção de sideróforos (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

3.4.7 Motilidade Tipo *Swarming* e Formação de Película em Superfície

Para determinar a motilidade das rizobactérias, foi preparada suspensão de células em água na concentração $O.D._{600} = 0,3$ a partir de colônias puras com crescimento *overnight*. Dez microlitros da suspensão foram inoculados no centro de uma placa de 80 mm de diâmetro com meio Ágar Triptona de Soja (TSA) na concentração de 0,75%. As culturas foram incubadas a 28°C durante 12h e ao final do teste foi determinado o diâmetro das colônias bacterianas. Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para a formação do biofilme, uma placa de 24 poços de fundo chato contendo 2 mL de caldo triptona de soja (TSB) foi inoculada com 10 µL de suspensão de células dos isolados de rizobactérias (concentração $O.D._{600} = 0,3$). O experimento foi realizado com quatro repetições (poços) por isolado de rizobactéria. As culturas foram incubadas a 28 °C durante 48 h e a formação de película foi avaliada qualitativamente: (+) isolado forma película na superfície do meio; (-) isolado não forma película na superfície do meio de cultura) (TEIXEIRA et al., 2021).

3.4.8 Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA)

A determinação da capacidade de produção de Ácido-Indol-Acético (AIA) dos isolados de rizobactérias foi determinada por meio da quantificação colorimétrica através do reagente de Salkowsky (SARWAR; KREMER, 1995 modificado por BAUTISTA; GALLARDO, 2008). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio LB a 28 °C e 180 rpm durante 48 h. Uma alíquota de 100 µL deste inóculo foi adicionado a 10 mL de meio LB suplementado com 100 mg L⁻¹ de L-triptofano e incubado a 28 °C e 180 rpm durante 72 h. A cultura foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos para obtenção do SLC. Um mL do SLC foi adicionado a 2 mL de reagente de Salkowsky modificado (FeCl₃ 40 mM; H₂SO₄ 7,9 M) e mantido no escuro a 25 °C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 530 nm em espectrofotômetro.

A curva de AIA padrão utilizada para comparação foi realizada com concentração crescente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 µg mL⁻¹ de AIA comercial misturado com o reagente de Salkowsky na proporção de 1:2,

respectivamente. A reação e leitura da absorbância foram feitas nas mesmas condições descritas anteriormente. As reações do SLC e reagente de Salkowsky foram realizadas em triplicatas. Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4.9 Atividade Hemolítica em Meio Ágar Sangue e Detecção de Enzimas Líticas

A atividade hemolítica para verificar a biossíntese de biosurfactante foi determinada em placas de Petri contendo meio ágar-sangue (15 gL^{-1} de Agar e 60 mL L^{-1} de sangue de carneiro). Os isolados de rizobactérias foram inoculados no centro de placas de Petri com 60 mm de diâmetro contendo ágar-sangue e as culturas foram incubadas a 28°C no escuro, durante cinco dias. Foram realizadas avaliações aos dois e cinco dias após a inoculação e a formação de halo translúcido em torno da colônia indicou a biossíntese de surfactantes.

Para detecção da atividade da celulase, as rizobactérias foram cultivadas em meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose como única fonte de carbono (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014). Para a detecção de β -1,3-glucanase foi utilizada laminarina a 0,5% (RENWICK et al., 1991). As culturas foram incubadas durante 48 h a 28°C , posteriormente, foram coradas com solução de vermelho congo ($0,6 \text{ g L}^{-1}$) e o excesso de corante foi retirado com solução de NaCl (1 mol L^{-1}). A atividade proteolítica dos isolados foi verificada através da degradação da caseína em meio contendo leite desnatado em pó (1%), extrato de levedura (0,01%), KH_2PO_4 (0,15%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%) NaCl (0,5%) e ágar (1,5%) (ALMEIDA LOPES et al., 2016). As culturas foram incubadas durante 48 h a 28°C .

O delineamento experimental dos testes foi inteiramente casualizado com três repetições para a atividade hemolítica, celulase e proteolítica. Para detecção de glucanases o teste foi realizado em duplicata.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Coleta de Amostras e Isolamento de Rizobactérias

Como resultado das dez coletas realizadas foram obtidos 63 isolados de rizobactérias, os quais foram identificados de acordo com a data de coleta, local e material de origem (Tabela 1). As coletas 9, 3 e 2 apresentaram o maior número de isolados com características morfológicas diferentes, enquanto, a coleta 7 foi a que apresentou o menor número de colônias e isolados. Os isolados LAFUEL01, LAFUEL02 e LAFUEL03 já pertenciam à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da UEL.

Tabela 1 – Identificação, local de coleta e planta de origem dos isolados de rizobactérias.

Coleta	Data de coleta	Local de coleta	Material de origem	Isolado
-	-	-	Contaminante experimento (laboratório)	LAFUEL 01 LAFUEL 02 LAFUEL 03
1	out/22	Fazenda Escola UEL	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	LAFUEL 10 LAFUEL 11 LAFUEL 12 LAFUEL 13 LAFUEL 14 LAFUEL 15
2	out/22	Fazenda Escola UEL	Joá-bravo (<i>Solanum viarum</i>)	LAFUEL 20 LAFUEL 21 LAFUEL 22 LAFUEL 23 LAFUEL 24 LAFUEL 25 LAFUEL 26
3	out/22	Fazenda Escola UEL	Joá-bravo (<i>Solanum viarum</i>)	LAFUEL 30 LAFUEL 31 LAFUEL 32 LAFUEL 33 LAFUEL 34 LAFUEL 35 LAFUEL 36 LAFUEL 37
	out/22	Fazenda Escola	Joá-bravo	LAFUEL 40

4		UEL	(Solanum viarum)	LAFUEL 41
				LAFUEL 42
				LAFUEL 43
				LAFUEL 44
				LAFUEL 45
5	out/22	Fazenda Escola UEL	Joá-bravo (Solanum viarum)	LAFUEL 50
				LAFUEL 51
				LAFUEL 53
				LAFUEL 54
				LAFUEL 55
6	jan/23	Centro de Ciências Agrárias UEL	Maria-pretinha (Solanum americanum)	LAFUEL 56
				LAFUEL 60
				LAFUEL 61
				LAFUEL 62
				LAFUEL 63
				LAFUEL 64
				LAFUEL 65
7	jan/23	Centro de Ciências Agrárias - UEL	Pimenta (Capsicum sp.)	LAFUEL 66
				LAFUEL 67
				LAFUEL 70
8	jan/23	Centro de Ciências Agrárias - UEL	Maria-pretinha (Solanum americanum)	LAFUEL 71
				LAFUEL 72
				LAFUEL 80
				LAFUEL 81
				LAFUEL 82
				LAFUEL 83
9	jan/23	Centro de Ciências Agrárias - UEL	Maria-pretinha (Solanum americanum)	LAFUEL 84
				LAFUEL 85
				LAFUEL 90
				LAFUEL 91
				LAFUEL 92
				LAFUEL 93
				LAFUEL 94
10	jan/23	Centro de Ciências Agrárias - UEL	Maria-pretinha (Solanum americanum)	LAFUEL 95
				LAFUEL 96
				LAFUEL 97
				LAFUEL 100
				LAFUEL 101
				LAFUEL 102
				LAFUEL 103
				LAFUEL 104
				LAFUEL 104

Fonte: próprio autor (2024).

A rizosfera é considerada um ambiente rico tratando-se de diversidade microbiana (CARDOSO; ANDREOTE 2016). Isso se deve à liberação de

compostos como açúcares provenientes da fotossíntese, nutrientes e água liberados pelas raízes das plantas, que favorecem o crescimento e desenvolvimento de populações de microrganismos (COSTA, 2012). A diversidade bacteriana associada a rizosfera é muito complexa e dinâmica, de tal forma que o número de espécies e populações associadas as raízes das plantas pode mudar de acordo com a espécie da planta, condições ambientais e a presença de outras bactérias (BABALOLA, 2010). Esses fatos evidenciam e explicam a diversidade de rizobactérias observada a partir dos isolamentos realizados neste estudo.

3.4.2 Teste de Cultura Dupla por Suspensão de Células

Os resultados de inibição do crescimento de bactérias fitopatogênicas em teste de cultura dupla com as rizobactérias são apresentados na Tabela 2 e Figura 3.

Após 96h de incubação, 69% das rizobactérias testadas apresentaram algum grau de antagonismo contra as quatro bactérias fitopatogênicas estudadas, enquanto 31% das rizobactérias não apresentaram potencial antagônico contra as bactérias fitopatogênicas.

Tabela 2 – Halo de inibição do crescimento de *Xanthomonas euvesicatoria* (Xeu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Ralstonia solanacearum* (Rs) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) em teste de cultura dupla com rizobactérias antagonistas.

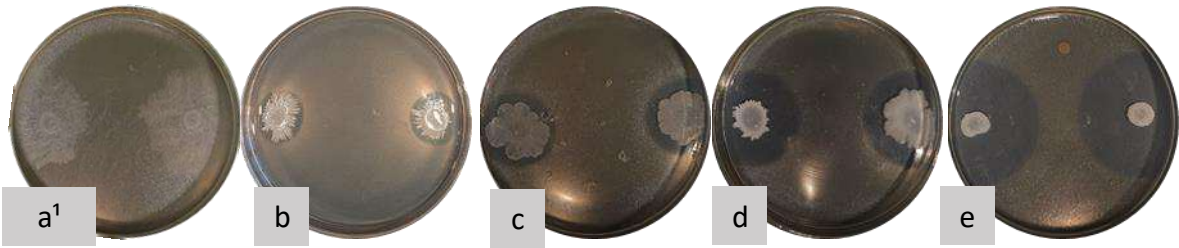
Isolado	Bactéria fitopatogênica							
	Xeu		Pst		Rs		Cmm	
	48h	96h	48h	96h	48h	96h	48h	96h
LAFUEL 01	++++ ¹	++++	+	++	++++	++++	+++	+++
LAFUEL 02	+++	+++	-	++	+	++	+	+
LAFUEL 03	+++	+++	-	-	-	+++	++	+++
LAFUEL 10	+++	++++	-	++	-	++	-	++
LAFUEL 11	+++	++++	+	++	++	+++	++	+++
LAFUEL 12	+++	++++	++	+++	+	++	+	++
LAFUEL 13	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 14	+++	++++	+	+++	+	+++	-	++
LAFUEL 15	+++	++++	+	+++	-	++	-	+
LAFUEL 20	+++	+++	-	++	-	++	+++	+++
LAFUEL 21	+++	++++	-	++	+++	+++	-	++
LAFUEL 22	++	++	-	-	-	-	-	+

LAFUEL 23	+++	+++	-	++	++	+++	-	+
LAFUEL 24	+++	+++	+	+++	-	+	-	-
LAFUEL 25	++++	++++	-	++	+++	+++	++	++
LAFUEL 26	++++	++++	+	++	+	++	+++	+++
LAFUEL 30	+++	+++	+	++	-	+++	-	+
LAFUEL 31	++++	++++	+	++	++	+++	++	++
LAFUEL 32	+++	+++	++	+++	-	+++	-	-
LAFUEL 33	++++	++++	+	+	+++	+++	+++	+++
LAFUEL 34	+++	+++	+	++	-	++	++	++
LAFUEL 35	++	++	+	++	-	++	-	++
LAFUEL 36	+++	+++	-	+++	+	++	-	++
LAFUEL 37	++++	++++	+	+++	-	++	-	+
LAFUEL 40	++++	++++	++	+++	+++	++++	+++	+++
LAFUEL 41	++	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 42	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++
LAFUEL 43	+++	+++	+++	++++	+	+++	++	++
LAFUEL 44	-	-	-	-	-	-	++	-
LAFUEL 45	-	-	-	-	+	+++	++	++
LAFUEL 50	+++	++	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 51	-		-	-	++	++++	-	-
LAFUEL 53	-	-	-	-	-	-	+	-
LAFUEL 54	-	-	-	-	-	++	++	+
LAFUEL 55	-	-	-	-	++	++	-	-
LAFUEL 56	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 60	++++	++++	+	+	-	+++	++	++++
LAFUEL 61	-	-	-	-	-	-	+++	++
LAFUEL 62	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 63	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 64	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 65	-	-	-	-	-	+	-	-
LAFUEL 66	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 67	-	-	-	-	-	-	-	++++
LAFUEL 70	+++	+++	+	+	+	+++	++	++
LAFUEL 71	++	++	+	++	-	++	-	-
LAFUEL 72	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 80	+	+	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 81	++	++	-	+	+	++	++	+++
LAFUEL 82	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 83	-	-	-	-	+	+	-	-
LAFUEL 84	+++	+++	++	++	+	++	++	+++
LAFUEL 85	++++	++++	++	++	+++	+++	++	++
LAFUEL 90	-	-	-	-	-	-	-	+
LAFUEL 91	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 92	-	-	-	-	-	-	-	-

LAFUEL 93	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 94	+++	++++	-	-	++	+++	+++	+++
LAFUEL 95	-	-	-	-	-	++	-	-
LAFUEL 96	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 97	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 100	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 101	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 102	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 103	-	-	-	-	-	-	-	-
LAFUEL 104	-	-	-	-	-	+	-	-

¹(-) sem halo ou ausência de efeito antagônico; (+) pequeno halo de até 2 mm ou pouco antagonismo; (++) halo médio de 3 a 5 mm ou atividade antagônica mediana; (+++) halo grande de 6 a 10 mm ou atividade antagônica alta; (++++) halo muito grande > 10 mm ou atividade antagônica muito alta.
Fonte: próprio autor (2023).

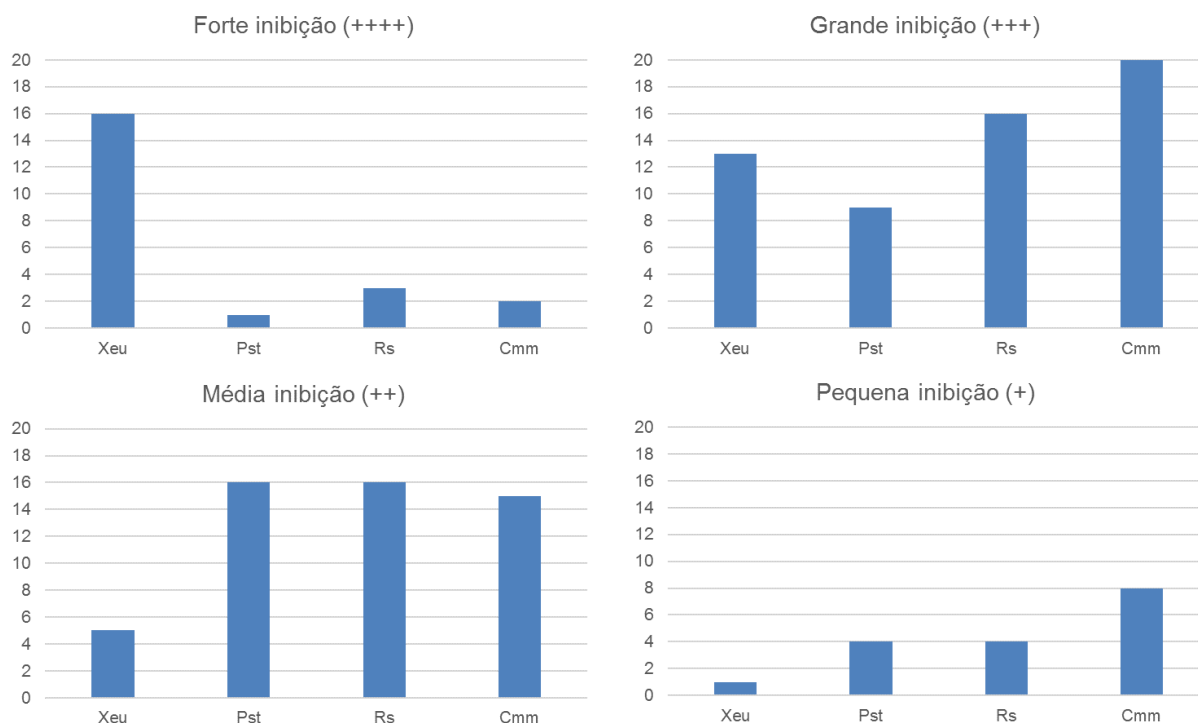
Figura 3 – Caracterização dos halos de inibição observados no teste de cultura dupla com suspensão de células das rizobactérias antagonistas.



¹a: (-) sem halo ou ausência de efeito antagônico; b: (+) pequeno halo de até 2 mm ou pouco antagonismo; c: (++) halo médio de 3 a 5 mm ou atividade antagônica mediana; d: (+++) halo grande de 6 a 10 mm ou atividade antagônica alta; e: (++++) halo muito grande > 10 mm ou atividade antagônica muito alta.
Fonte: próprio autor (2024).

Após 96 h verificou-se que o maior número de isolados de rizobactérias com forte inibição (++++) foi contra *X. euvesicatoria*. Vinte isolados apresentaram grande (+++) inibição contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dezesseis isolados apresentaram inibição média contra *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum* e oito isolados apresentaram pequena inibição contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 4).

Figura 4 – Número de isolados para cada nível de inibição contra *Xanthomonas euvesicatoria* (Xeu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.



Fonte: próprio autor (2024).

Hernández-Huerta et al. (2023) coletaram amostras de solo de áreas produtoras de pimenta e obtiveram 21 isolados bacterianos, principalmente do gênero *Bacillus*. As rizobactérias foram cultivadas conjuntamente com os isolados Xp47 e Xe65 de *X. euvesicatoria* em meio líquido e, posteriormente, foram ressemeados em meio de cultura sólido. Os autores observaram que todas as bactérias antagonistas inibiram o crescimento de colônias dos isolados Xp47 e Xe65 após a semeadura.

Sampathkumar et al. (2023) isolaram quarenta e oito rizobactérias associadas a raízes de algodoeiro e em teste de antagonismo com células, determinaram que vinte isolados inibiram o crescimento de *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*, agente causal da mancha do algodoeiro.

O período de incubação aumentou o potencial antagônico das rizobactérias contra *P. syringae* pv. *tomato*, uma vez que 48h após a incubação as culturas apresentaram pequeno ou nenhum halo de inibição. Após 96h, a atividade antagônica foi maior, considerando que o tamanho e número de isolados que produziram halo de inibição aumentou. Para Xeu, Rs e Cmm o tempo de incubação

entre as duas avaliações realizadas não influenciou o potencial antagônico, uma vez que as rizobactérias que produziram halo de inibição já expressaram, em sua grande maioria, a sua total capacidade antagônica após 48h.

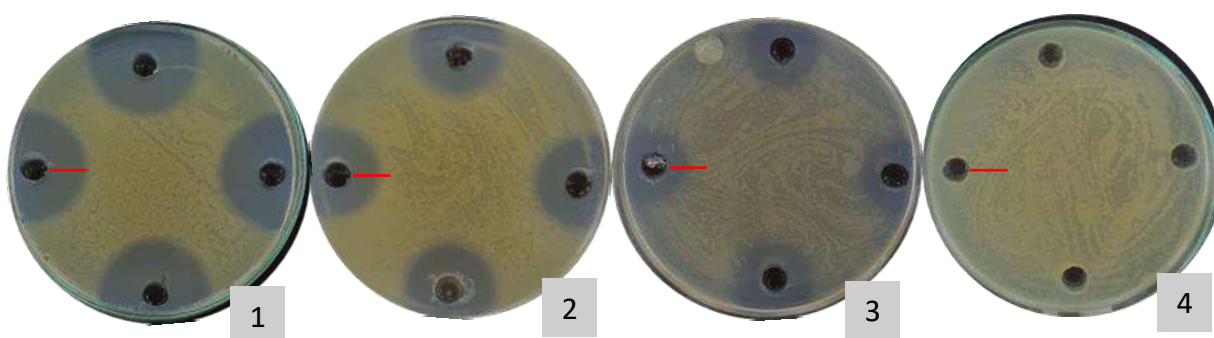
Alamer et al. (2020) coletaram dez amostras de rizosfera e obtiveram 245 isolados bacterianos. No teste de atividade antagônica contra *R. solanacearum*, onze e três isolados de rizobactérias apresentaram halos de inibição maiores que 15 e 17 mm, respectivamente. Seis isolados se destacaram com zona de inibição maior que 20 mm.

Suresh et al. (2021) testaram 87 bactérias isoladas de material rizosférico de tomateiro e obtiveram 30 rizobactérias com potencial antagônico contra *R. solanacearum*, destacando-se o isolado VSMKU3054 que apresentou 28 mm de halo de inibição.

3.4.3 Teste de Antagonismo por Sobrenadante Livre de Células (SLC)

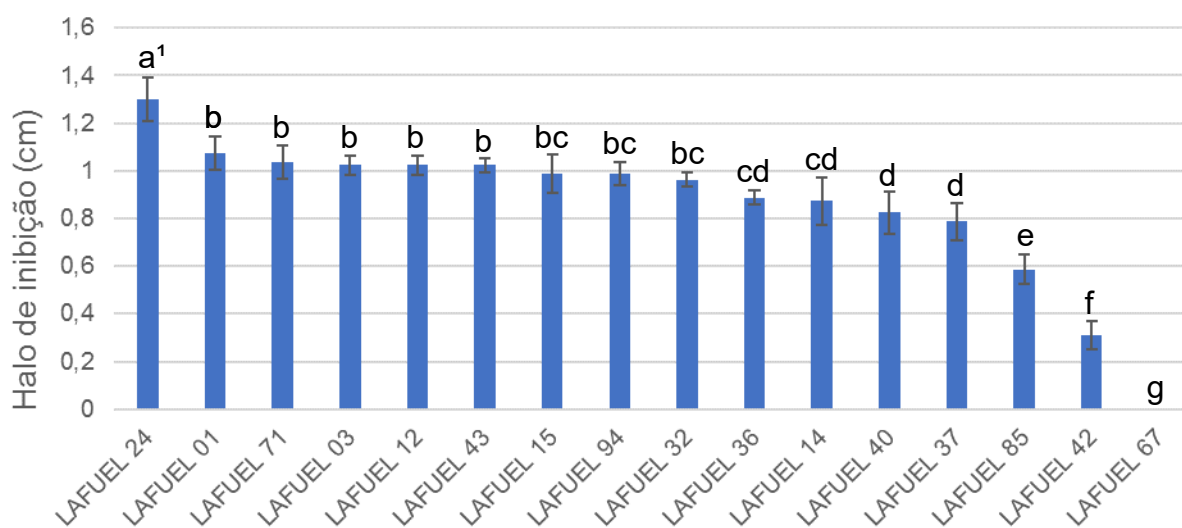
O SLC das rizobactérias selecionadas no teste de cultura dupla formaram halo de inibição para *X. euvesicatoria*, exceto o LAFUEL67. (Figuras 5 e 6). O SLC de LAFUEL24 promoveu halo de inibição de 1,3 cm, enquanto o SLC dos demais isolados promoveram halos que variaram de 0,3 a 1,1 cm.

Figura 5 – Halos de inibição observados no teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias contra *Xanthomonas euvesicatoria* (Xeu).



¹SLC de LAFUEL24 vs. Xeu; ²SLC de LAFUEL 01 vs. Xeu; ³SLC de LAFUEL85 vs. Xeu; ⁴SLC de LAFUEL67 vs. Xeu. Barra representa 13 mm. **Fonte:** próprio autor (2024).

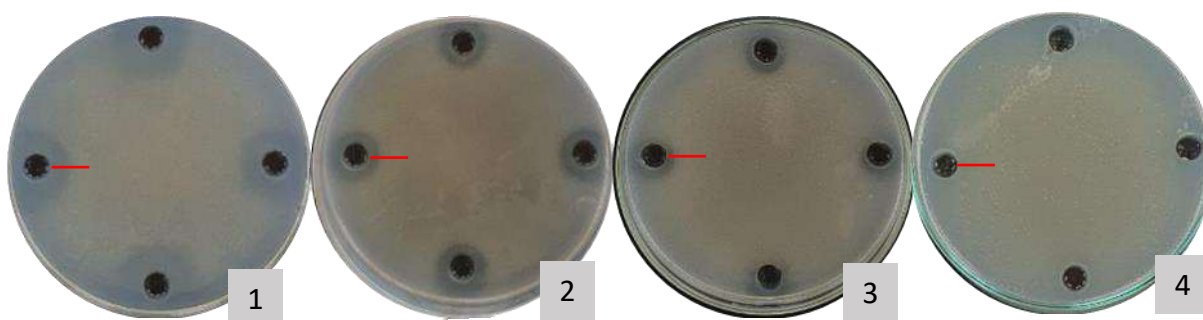
Figura 6 – Tamanho do halo de inibição do crescimento de *Xanthomonas euvesicatoria* em teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias antagonistas.



¹Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. **Fonte:** próprio autor (2024).

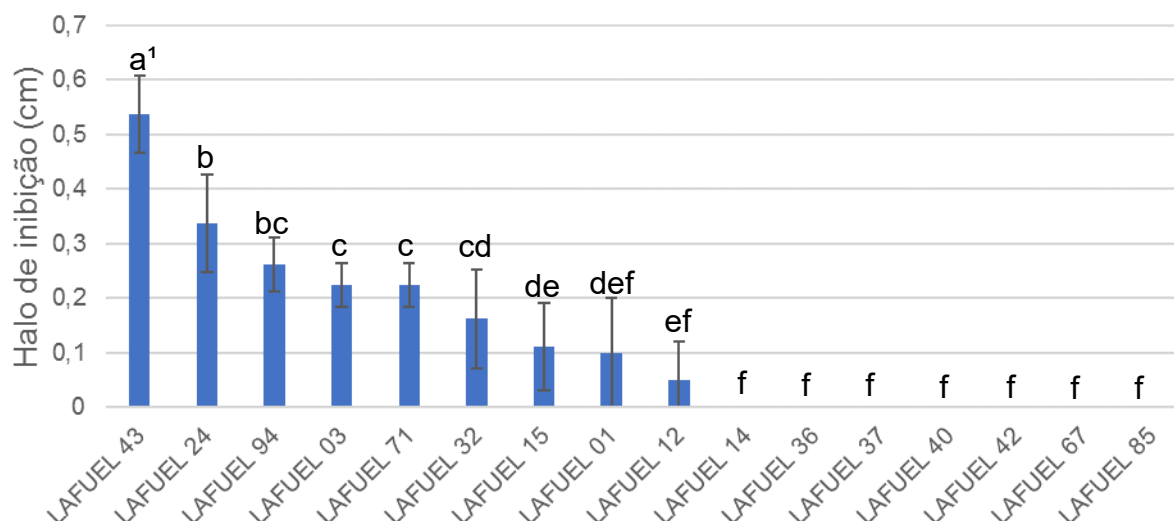
Os metabólitos de LAFUEL 43 produziram o maior halo de inibição (0,5 cm) contra *R. solanacearum*. Por outro lado, LAFUEL 14, 36, 37, 40, 42, 67 e 85 não inibiram o desenvolvimento da bactéria fitopatogênica (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Halos de inibição observados no teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum* (Rs).



¹SLC de LAFUEL43 vs. Rs; ²SLC de LAFUEL03 vs. Rs; ³SLC de LAFUEL32 vs. Rs; ⁴SLC de LAFUEL85 vs. Rs. Barra representa 13 mm. **Fonte:** próprio autor (2024).

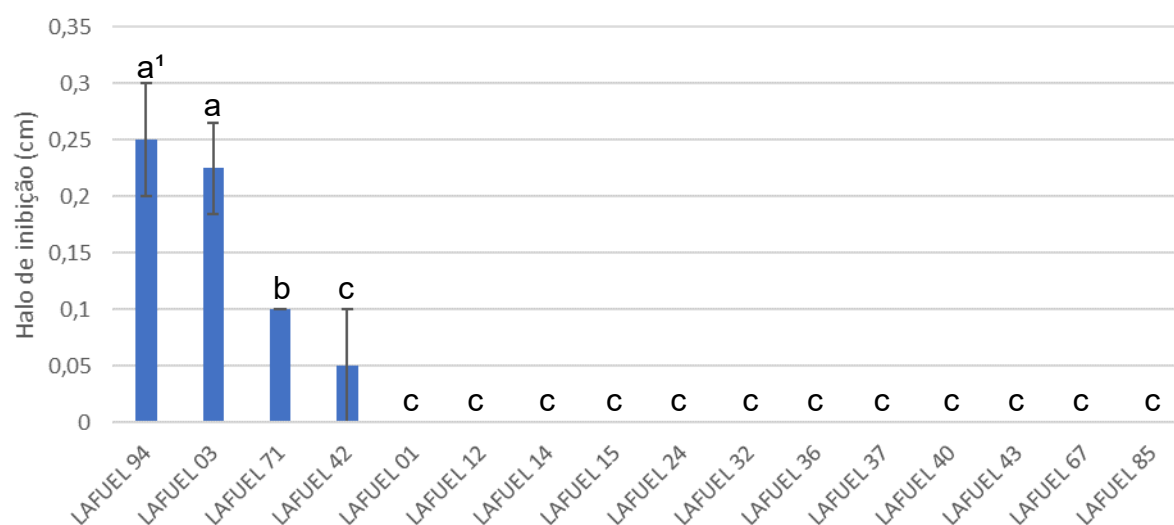
Figura 8 – Tamanho do halo de inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* em cultura dupla com SLC de rizobactérias antagonistas.



¹Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. **Fonte:** próprio autor (2024).

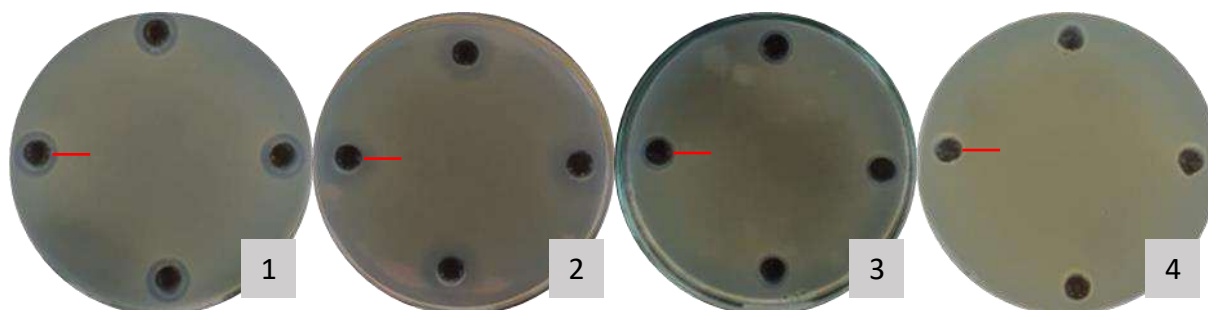
Contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, o SLC de LAFUEL 94 e 03 apresentaram halos de inibição de 0,25 e 0,2 cm, respectivamente. LAFUEL 71 e 42 apresentaram halos de até 1 mm e os metabólitos dos isolados LAFUEL 01, 12, 14, 15, 24, 32, 36, 37, 40, 43, 67 e 85 não apresentaram efeito inibitório (Figuras 9 e 10).

Figura 9 – Halos de inibição do crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em teste de cultura dupla com SLC de rizobactérias antagonistas.



¹Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. **Fonte:** próprio autor (2024).

Figura 10 – Halos de inibição observados no teste cultura dupla com SLC de rizobactérias contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).



¹SLC de LAFUEL94 vs. Cmm; ²SLC de LAFUEL42 vs. Cmm; ³SLC de LAFUEL71 vs. Cmm; ⁴SLC de LAFUEL85 vs. Cmm. Barra representa 13 mm. **Fonte:** próprio autor (2024).

A antibiose dos metabólitos das rizobactérias contra *R. solanacearum*, avaliada pelo tamanho do halo formado, foi menor que a registrada para *X. euvesicatoria*. Os halos de inibição formados no teste contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foram ainda menores que para *R. solanacearum*. Nenhum SLC teve efeito sobre o crescimento de *P. syringae* pv. *tomato*.

Bertoglio et al. (2023) verificaram a atividade antagônica do isolado LABIM17 de *Brevibacillus brevis* contra *X. euvesicatoria* em teste de difusão em ágar dos metabolitos liofilizados. Na concentração de 1000 µg mL⁻¹ foi verificada a formação de halo de inibição de 19,2 mm de diâmetro.

Im et al. (2020) fracionaram os metabolitos produzidos pela rizobactéria DR-08 de *Bacillus methylotrophicus* e identificaram a difficidina e oxidificidina como os principais compostos produzidos pela bactéria. A atividade antagônica dos compostos e SLC foram testadas no controle *in vitro* de 14 bactérias fitopatogênicas, entre elas *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas euvesicatoria*. Como resultado, os compostos inibiram o desenvolvimento de 12 bactérias fitopatogênicas, incluindo as citadas anteriormente.

Os isolados de *Bacillus* sp. LAFUEL01, LAFUEL02 e *Bacillus velezensis* LAFUEL03 foram testadas *in vitro* contra diversos fitopatógenos. LAFUEL01, 02 e 03 inibiram o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea* em 65,5; 63,8 e 64,8%, respectivamente (PAULA et al., 2022). LAFUEL03 em teste de cultura dupla inibiu 47 e 44% o crescimento micelial dos fungos *Macrophomina*

phaseolina e *Sclerotium rolfsii* (PAULA et al., 2021). Em teste de difusão dos metabólitos em ágar, LAFUEL03 inibiu o crescimento dos isolados UFU-E43, UFU-E4 e UFU-B13 de *Pantoea annanatis* (PAULA et al., 2021). Duin et al. (2022), verificaram em teste de difusão em ágar que os isolados LAFUEL01, 02 e 03 inibiram o crescimento da bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. No teste foi observado halo de inibição de 31, 29 e 33 mm de tamanho, respectivamente.

Embora alguns isolados tenham apresentado potencial antagônico contra as bactérias fitopatogênicas em cultura dupla, quando testado o antagonismo pelo SLC não houve a formação de halo de inibição. Evidenciando que o antagonismo não deriva apenas da antibiose, podendo ser associado a fatores como a competição por nutrientes.

3.4.4 Teste de Solubilização de Fosfato e Produção de Sideróforos

Quanto a capacidade de solubilizar fosfatos, 11 rizobactérias formaram halo translúcido em torno de sua colônia (16%), indicando serem positivas para a solubilização de fósforo (Tabela 3 e Figura 11). A produção de sideróforos foi observada em 59 isolados (88%), pois formaram halo translúcido de coloração laranja em torno da colônia, indicando serem positivos para esta característica (Tabela 3 e Figura 12).

Tabela 3 – Produção de sideróforos em meio Chrome Azurol S e atividade solubilizadora de fosfato em meio GL por isolados de rizobactérias.

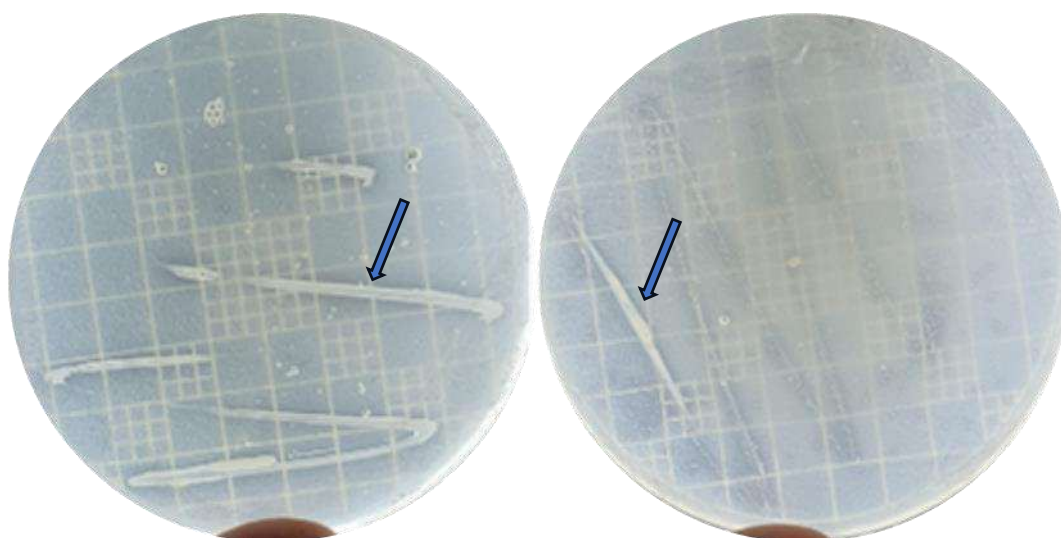
Isolado	Produção de sideróforos	Solubilização de fosfato
LAFUEL 01	+ ¹	-
LAFUEL 02	+	-
LAFUEL 03	+	-
LAFUEL 10	+	-
LAFUEL 11	+	-
LAFUEL 12	+	-
LAFUEL 13	-	+
LAFUEL 14	+	-
LAFUEL 15	+	-
LAFUEL 20	+	-
LAFUEL 21	+	-
LAFUEL 22	+	-
LAFUEL 23	+	-
LAFUEL 24	+	-

LAFUEL 25	+	-
LAFUEL 26	+	-
LAFUEL 30	+	-
LAFUEL 31	+	-
LAFUEL 32	+	-
LAFUEL 33	+	-
LAFUEL 34	+	-
LAFUEL 35	+	-
LAFUEL 36	+	-
LAFUEL 37	+	-
LAFUEL 40	+	-
LAFUEL 41	+	-
LAFUEL 42	+	-
LAFUEL 43	+	-
LAFUEL 44	+	-
LAFUEL 45	+	-
LAFUEL 50	+	-
LAFUEL 51	-	+
LAFUEL 53	+	-
LAFUEL 54	+	+
LAFUEL 55	+	-
LAFUEL 56	+	-
LAFUEL 60	+	-
LAFUEL 61	+	+
LAFUEL 62	+	+
LAFUEL 63	+	-
LAFUEL 64	+	+
LAFUEL 65	-	+
LAFUEL 66	-	+
LAFUEL 67	+	-
LAFUEL 70	+	-
LAFUEL 71	+	-
LAFUEL 72	+	-
LAFUEL 80	+	+
LAFUEL 81	+	-
LAFUEL 82	+	-
LAFUEL 83	+	-
LAFUEL 84	+	-
LAFUEL 85	+	-
LAFUEL 90	+	-
LAFUEL 91	+	-
LAFUEL 92	-	-
LAFUEL 93	+	+
LAFUEL 94	+	-
LAFUEL 95	+	-

LAFUEL 96	+	-
LAFUEL 97	+	-
LAFUEL 100	-	-
LAFUEL 101	-	-
LAFUEL 102	+	-
LAFUEL 103	+	+
LAFUEL 104	+	-

¹(+) positivo; (-) negativo. **Fonte:** próprio autor (2024).

Figura 11 – Halo transparente em torno da colônia de rizobactéria indicando solubilização de fosfato em meio GL.



Fonte: próprio autor (2024).

Figura 12 – Halo translúcido alaranjado em torno da colônia de rizobactéria indicando produção de sideróforos em meio Chrome Azurol S.



Fonte: próprio autor (2024).

Bibi et al. (2023) isolaram 55 rizobactérias e as testaram quanto a solubilização de fosfato em meio NBRIP. Do total, somente os isolados SOVERS5 e ANABR3 foram capazes de solubilizar fosfato em meio sólido. Gupta et al. (2022) caracterizaram 37 isolados de bactérias provenientes da rizosfera de plantas de

arroz quanto à capacidade de solubilizar fosfato. A atividade solubilizadora foi determinada em meio ágar Pikovskaya e 12 isolados bacterianos testados formaram halo de até 3 mm de diâmetro. A concentração de fósforo solúvel disponível para as raízes das plantas é altamente influenciada pela atividade dos microrganismos do solo. As rizobactérias disponibilizam o nutriente para as plantas por meio da solubilização de fosfatos, uma vez que produzem ácidos orgânicos e enzimas que atuam na mineralização de fosfato (SOUZA et al., 2015).

Huo et al. (2021) realizaram testes qualitativos de produção de sideróforos utilizando cinco isolados de rizobactérias. Todos os isolados produziram sideróforos, com destaque para o isolado DCY119T que apresentou alta produção do composto. Estima-se que apenas uma pequena parte de rizobactérias sejam capazes de realizar a solubilização de fosfato. Aproximadamente apenas 20% das bactérias do solo solubilizariam fosfatos de forma eficiente (SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018).

Fiuza et al (2024) determinaram que os isolados SAC36 e BRC11 produzem sideróforos do tipo hidroxamato, indicados pela formação de cor laranja, enquanto os isolados SAF9, SAC33 e BRC9 produzem sideróforos do tipo catecol, indicados pela coloração roxo claro. Os autores ainda identificaram que as bactérias não foram boas solubilizadoras de fosfato.

Os sideróforos, produzidos por rizobactérias, são metabólitos secundários e agentes quelantes de ferro que disponibilizam o ferro de seu ambiente disponível para as células da população bacteriana. Com isso, a produção de sideróforos pela rizobactérias faz com que o ferro não fique disponível para as bactérias fitopatogênicas, limitando o crescimento e a colonização fitopatógenos (MOREALES et al., 2020).

3.4.4 Motilidade tipo *Swarming* e Formação de Película em Superfície

A motilidade tipo *swarming* de quatorze isolados pode ser considerada alta, pois cresceram sobre toda a superfície do meio de cultura. Enquanto doze isolados apresentaram baixa motilidade, considerando que não houve crescimento além da área do ponto de inoculação, cerca de 1 cm. A formação de película sobre o meio de cultura em placas de células com fundo chato foi observada em todos, exceto em seis isolados de rizobactérias: LAFUEL50, 61, 62,

67, 80 e 93 (Tabela 4).

Tabela 4 – Motilidade tipo *swarming* em meio ágar triptona de soja (0,75%) e formação de película na superfície de caldo triptona de soja.

Isolado	Diâmetro da colônia (cm)	Formação de película
LAFUEL71	5,0 a ¹	+ ²
LAFUEL70	5,0 a	+
LAFUEL67	5,0 a	-
LAFUEL54	5,0 a	+
LAFUEL45	5,0 a	+
LAFUEL01	5,0 a	+
LAFUEL11	4,9 a	+
LAFUEL30	4,8 a	+
LAFUEL36	4,7 a	+
LAFUEL25	4,7 a	+
LAFUEL43	4,6 a	+
LAFUEL85	4,6 a	+
LAFUEL14	4,5 a	+
LAFUEL60	4,5 a	+
LAFUEL21	4,2 b	+
LAFUEL26	4,1 b	+
LAFUEL32	4,1 b	+
LAFUEL94	4,0 b	+
LAFUEL31	4,0 b	+
LAFUEL03	3,8 b	+
LAFUEL40	3,7 b	+
LAFUEL24	3,6 b	+
LAFUEL20	3,4 b	+
LAFUEL15	3,3 b	+
LAFUEL12	3,2 b	+
LAFUEL23	3,2 b	+
LAFUEL02	2,7 c	+
LAFUEL35	2,7 c	+
LAFUEL37	2,6 c	+
LAFUEL84	2,4 c	+
LAFUEL34	2,3 c	+
LAFUEL33	2,1 c	+
LAFUEL22	1,9 c	+
LAFUEL42	1,9 c	+
LAFUEL61	1,5 d	-
LAFUEL50	1,4 d	-
LAFUEL103	1,4 d	+
LAFUEL62	1,3 d	-

LAFUEL55	1,1 d	+
LAFUEL80	1,1 d	-
LAFUEL93	1,0 d	-
LAFUEL10	0,9 d	+
LAFUEL66	0,9 d	+
LAFUEL64	0,9 d	+
LAFUEL51	0,8 d	+
LAFUEL65	0,6 d	+
LAFUEL13	s/d	s/d
C.V. (%)	24,45	

¹Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). ²(+) forma película; (-) não forma película. **Fonte:** próprio autor (2024).

Texeira et al. (2021), verificaram que o isolado CMRP 4490 de *B. velezensis* foi capaz de crescer sobre todo o meio de cultura (TSA 0,8%). O mesmo isolado também foi capaz de formar película na interface do meio de cultura/ar, demonstrando ser capaz de formar biofilme. A motilidade das rizobactérias é uma característica importante para o controle biológico, uma vez que possibilita a colonização e sobrevivência em diversos ambientes, conferindo vantagens competitivas ao microrganismo antagonista (MCCARTER & MORABE, 2019). Gao et al. (2016) associariam a capacidade de *B. subtilis* de colonizar raízes de tomate com a motilidade, demonstrando que a colonização e sobrevivência destas bactérias é dependente de sua motilidade e requer a presença de flagelos.

3.4.5 Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA)

Os isolados LAFUEL67 e LAFUEL93 se destacaram na produção de AIA, sendo detectados 8,7 e 5,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do fitormônio, respectivamente. LAFUEL51, LAFUEL50, LAFUEL62 e LAFUEL64 não produziram AIA, enquanto a produção dos demais isolados variaram de 0,29 a 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 13).

De Paula et al. (2021) testaram a capacidade de 15 isolados de rizobactérias de biossintetizar AIA e verificaram que todos produziram o fitormônio quando suplementados com triptofano. No teste, os isolados IS01 e IS14 produziram mais de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquadrando-se como grandes produtores de AIA.

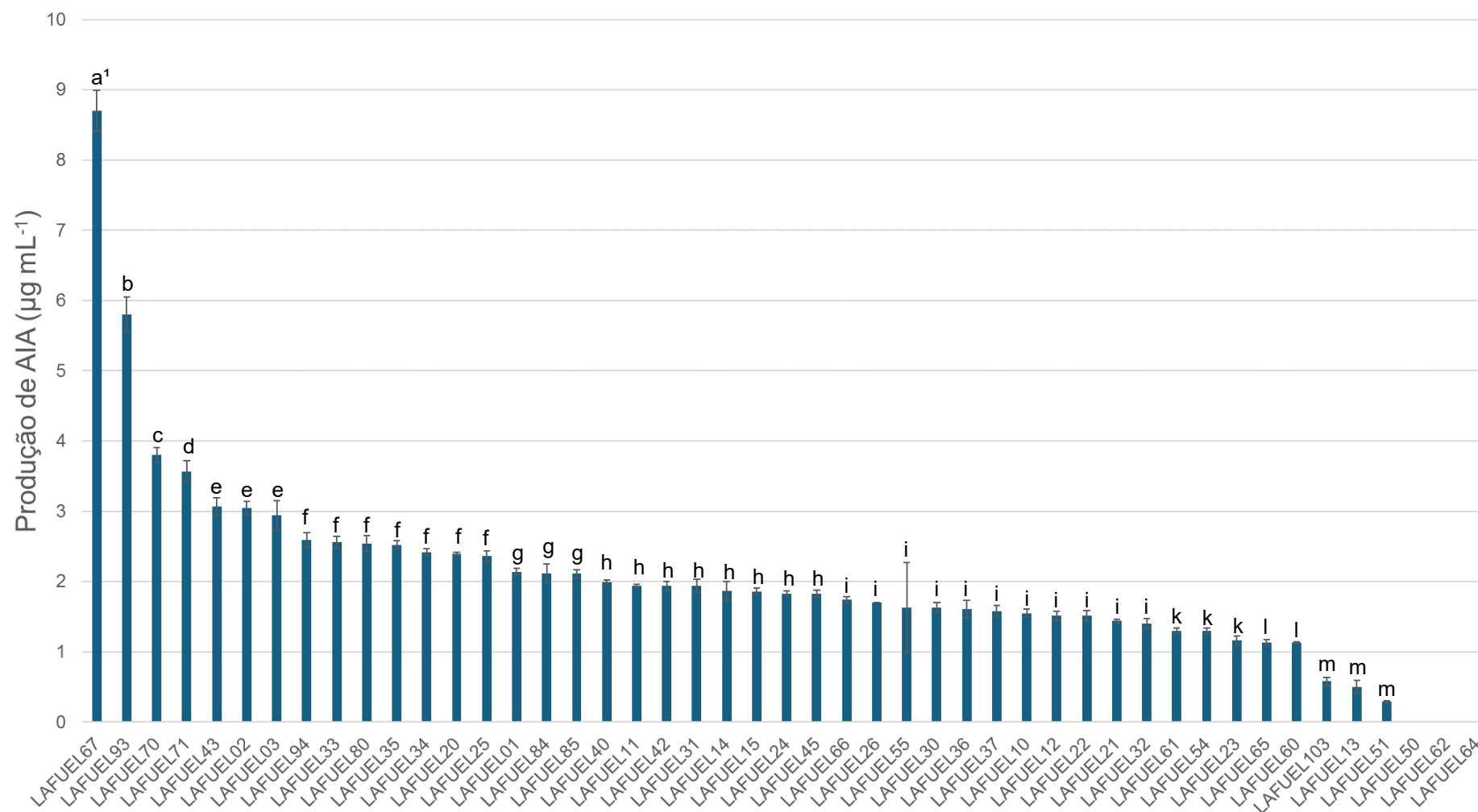
Embora a concentração de AIA observada por estes autores seja aproximadamente três vezes maior que o produzido pelo isolado LAFUEL67, a concentração de triptofano suplementado no meio foi cinco vezes maior que no presente trabalho.

Chagas Junior et al. (2022) testaram sete isolados de *Bacillus subtilis* quanto à produção de AIA em meio suplementado com 100 µg mL⁻¹ de triptofano e determinaram que todos os isolados produziram o hormônio vegetal sendo a maior produção de 1,95 µg mL⁻¹ para Bs 06. Neste caso, LAFUEL67 produziu cerca de 4 vezes mais AIA em comparação com a Bs 06, utilizando a mesma concentração de triptofano.

As rizobactérias são descritas como produtoras de AIA, contudo sua eficiência relaciona-se diretamente com a disponibilidade de triptofano no seu nicho de colonização. A associação entre bactérias e plantas favorece a produção do hormônio vegetal, uma vez que o triptofano pode ser liberado através da exsudação radicular, regulando a produção de AIA das rizobactérias (DUCA et al., 2014).

A auxina é o principal fitormônio regulador do desenvolvimento vegetal, incluindo morfogênese e respostas adaptativas (PORFÍRIO et al., 2016). Segundo Jiang et al. (2020) a auxina regula a divisão celular e alongamento das células por meio, moldando a arquitetura da planta e melhorando aspectos morfológicos das plantas, como a resistência ao acamamento.

Figura 13 – Concentração de Ácido-Indol-Acético (AIA) produzido por isolados de rizobactérias antagonistas cultivadas em meio Lúria-Bertani suplementado com 100 mg/L de L- triptofano.



¹Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão com base em 3 repetições. **Fonte:** próprio autor (2024).

3.4.6 Atividade Hemolítica em Meio Ágar Sangue e Detecção de Enzimas Líticas

A maioria das rizobactérias estudadas apresentou atividade hemolítica em meio ágar-sangue após 120 h indicando a produção de biossurfactantes. Apenas seis isolados não mostraram halo indicativo de atividade hemolítica (Tabela 5).

A atividade proteolítica avaliada pela degradação da caseína em meio com leite foi verificada em todos os isolados testados. A atividade de celulases foi observada em todos os isolados, exceto LAFUEL13, 51,64, 65, 66, 67, 93 e 103. Não foi detectada produção de glucanases em nenhum isolado de rizobactéria (Tabela 5 e Figura 14).

Tabela 5 – Atividade hemolítica (em meio ágar sangue), proteolítica (em meio contendo leite desnatado em pó 1%) e produção de celulases (em meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose) e glucanases (em meio com laminarina 0,5%) de rizobactérias.

Isolado	Ativ. hemolítica ¹	Proteases ²	Celulases ³	Glucanases ⁴
LAFUEL 01	+	+	+	-
LAFUEL 02	+	+	+	-
LAFUEL 03	+	+	+	-
LAFUEL 10	+	+	+	-
LAFUEL 11	+	+	+	-
LAFUEL 12	+	+	+	-
LAFUEL 13	+	+	-	-
LAFUEL 14	+	+	+	-
LAFUEL 15	+	+	+	-
LAFUEL 20	+	+	+	-
LAFUEL 21	+	+	+	-
LAFUEL 22	+	+	+	-
LAFUEL 23	+	+	+	-
LAFUEL 24	+	+	+	-
LAFUEL 25	+	+	+	-
LAFUEL 26	+	+	+	-
LAFUEL 30	+	+	+	-
LAFUEL 31	-	+	+	-
LAFUEL 32	+	+	+	-
LAFUEL 33	+	+	+	-
LAFUEL 34	+	+	+	-
LAFUEL 35	+	+	+	-

LAFUEL 36	+	+	+	-
LAFUEL 37	+	+	+	-
LAFUEL 40	+	+	+	-
LAFUEL 42	-	+	+	-
LAFUEL 43	+	+	+	-
LAFUEL 45	+	+	+	-
LAFUEL 50	+	+	+	-
LAFUEL 51	+	+	-	-
LAFUEL 54	+	+	+	-
LAFUEL 55	-	+	+	-
LAFUEL 60	+	+	+	-
LAFUEL 61	+	+	+	-
LAFUEL 62	+	+	+	-
LAFUEL 64	-	+	-	-
LAFUEL 65	-	+	-	-
LAFUEL 66	-	+	-	-
LAFUEL 67	+	+	-	-
LAFUEL 70	+	+	+	-
LAFUEL 71	+	+	+	-
LAFUEL 80	+	+	+	-
LAFUEL 84	+	+	+	-
LAFUEL 85	+	+	+	-
LAFUEL 93	+	+	-	-
LAFUEL 94	+	+	+	-
LAFUEL 103	-	+	-	-

(+) produz o composto estudado; (-) não produz o composto estudado.¹Atividade hemolítica em meio ágar sangue. ²Atividade proteolítica em meio contendo leite desnatado (1%). ³Atividade de celulases em meio mineral contendo carboximetilcelulose (0,5%). ⁴Atividade de glucanases em meio mineral contendo laminarina (0,5%). **Fonte:** próprio autor (2024).

Os biossurfactantes, responsáveis pela degradação do sangue presente no meio de cultura, constituem o grupo de moléculas que podem estar envolvidas na ação antimicrobiana de diversas rizobactérias, como as surfactinas, iturinas e fengicinas (STEIN, 2005). Diversos autores já relataram a produção de biossurfactantes por rizobactérias, como *B. amyloliquefaciens* EZ1509 na produção de surfactinas, fengicinas, iturinas (FARZAND et al., 2019); e *B. amyloliquefaciens* GGA na produção de surfactinas e fengicinas (RASHAD et al., 2020).

A atividade dos biossurfactantes não se limita ao seu poder antimicrobiano, uma vez que auxilia as rizobactérias em funções de mobilidade como *swarming* e formação de biofilme. Isolados que não são capazes de produzirem compostos como a surfactina não costumam formar biofilme e não possuem mobilidade (FIRA et al., 2018). Neste sentido, é possível associar a baixa

motilidade dos isolados LAFUEL42, 55, 64, 65 e 66 a não produção de biosurfactantes, uma vez que o diâmetro da colônia destes isolados chegou a apenas 1,9 cm, enquanto, LAFUEL71 produziu surfactantes e apresentou colônia com diâmetro de 5,0cm.

Figura 14 – Halos translúcidos indicando a atividade hemolítica (em meio ágar sangue), proteolítica (em meio contendo 1% de leite desnatado) e celulolítica (em meio mineral contendo celulose como única fonte de carbono) das rizobactérias antagonistas.



Fonte: próprio autor (2024).

A atividade proteolítica é relevante, pois participa da lise da parede celular fúngica, degradando a camada mais externa e permitindo que outras moléculas degradem as camadas mais internadas da parede celular fúngica (PÉREZ-FUENTES et al., 2014). A produção de enzimas que degradam a celulose é fundamental para a atividade antimicrobiana contra oomicetos, uma vez que a parede celular destes pseudofungos é composta por celulose (JÚNIOR, 2018).

3.5 CONCLUSÃO

Dos 66 isolados de rizobactérias testados, 69% apresentaram algum grau de antagonismo *in vitro* contra *Xanthomonas euvesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Alguns isolados apresentaram efeito antagônico em teste de cultura dupla com SC mas não no teste com SLC, mostrando que mecanismos antagônicos diferentes da produção de metabólitos tóxicos estão envolvidos nesta interação. Neste sentido, a produção de sideróforos, enzimas líticas e surfactantes, a motilidade e a capacidade de formação de biofilme contribuem com a atividade antagônica de rizobactérias contra bactérias fitopatogênicas.

A maioria dos isolados apresentaram características positivas e desejáveis nos testes realizados *in vitro*, como: antibiose, produção de biosurfactantes, enzimas hidrolíticas, proteases, produção de AIA e solubilização de fosfato. Com isso, apresentam potencial de serem usadas como agentes de biocontrole de doenças bacterianas e promoção do crescimento do tomateiro.

4 ARTIGO B

CONTROLE DA PINTA BACTERIANA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO POR RIZOBACTÉRIAS

4.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de isolados de rizobactérias no controle da pinta bacteriana, em plantas inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e a capacidade de promover o crescimento em tomateiro. Foram selecionados oito isolados de rizobactérias que apresentaram potencial antagônico *in vitro* contra *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) em teste de cultura dupla e de produção de Ácido-Indol-Acético (AIA) e solubilização de fosfato. Plantas de tomateiro, cultivar Santa Cruz Kada, em estágio V3 foram pulverizadas com suspensão de células das rizobactérias 72 h antes da inoculação com suspensão de células de Pst. As plantas foram acondicionadas em câmara úmida 24 h antes e 48 h após a inoculação com Pst. Para o teste de promoção inicial de tomateiro, sementes de tomateiro, cultivar Santa Cruz Kada, foram microbiolizadas e acondicionadas em caixa do tipo gerbox durante 14 dias. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A pulverização foliar com SC de LAFUEL01 e LAFUEL40 diminuiu significativamente o número de lesões da pinta bacteriana em tomateiro. Nenhum isolado de rizobactéria promoveu aumento da porcentagem de germinação e peso da matéria fresca de plântulas (aos 14 dias) oriundas de sementes microbiolizadas com suspensão de células. Portanto, os isolados selecionados com base em testes *in vitro*, demonstraram potencial para serem utilizados no biocontrole da pinta bacteriana, principalmente LAFUEL01 e LAFUEL40. Embora os isolados selecionados tenham apresentado capacidade de solubilizar fosfato e produzir AIA *in vitro*, não foi observada promoção de crescimento vegetal em plântulas aos 14 dias. O tempo de avaliação do crescimento de plântulas pode ter sido insuficiente para observar efeitos decorrentes da produção de AIA e solubilização de fosfato dos isolados bacterianos, os quais podem ser evidenciados em estádios fenológicos mais avançados.

Palavras-chave: Biocontrole, Pinta bacteriana, Promoção de crescimento, Rizobactérias, Tomateiro.

4.2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of rhizobacterial isolates in controlling bacterial spot in plants inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and their ability to promote growth in tomato plants. Eight rhizobacterial isolates that showed in vitro antagonistic potential against *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) were selected in a double culture test and in the production of indole-acetic acid and phosphate solubilization. Tomato plants, cultivar Santa Cruz Kada, at V3 stage were sprayed with a suspension of rhizobacterial cells 72 h before inoculation with a suspension of Pst cells. The plants were placed in a humid chamber 24 h before and 48 h after inoculation with Pst. For the initial tomato promotion test, tomato seeds, cultivar Santa Cruz Kada, were microbiolized and placed in a gerbox for 14 days. The data were subjected to analysis of variance and the means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$). Foliar spraying with SC of LAFUEL01 and LAFUEL40 significantly reduced the number of lesions of bacterial spot in tomato plants. No rhizobacterial isolate promoted an increase in the germination percentage and fresh weight of seedlings (at 14 days) from seeds microbiolized with cell suspension. Therefore, the isolates selected based on in vitro tests demonstrated potential for use in the biocontrol of bacterial spot, especially LAFUEL01 and LAFUEL40. Although the selected isolates showed the ability to solubilize phosphate and produce IAA in vitro, no plant growth promotion was observed in seedlings at 14 days. The time for evaluating seedling growth may have been insufficient to observe effects resulting from IAA production and phosphate solubilization of the bacterial isolates, which can be evidenced in more advanced phenological stages.

Keywords: Biocontrol, Bacterial spot, Growth promotion, Rhizobacteria, Tomato.

4.3 INTRODUÇÃO

Em 2022, a produção brasileira de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) foi de 3,8 milhões de toneladas em área de 54 mil hectares, com rendimento médio de 69,9 kg ha⁻¹ (IBGE, 2024). Apesar do potencial econômico da cultura, a tomaticultura é constantemente afetada por doenças bacterianas que impactam drasticamente sua produtividade e rentabilidade, como a pinta bacteriana, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (INOUE-NAGATA et al., 2016).

A pinta bacteriana acomete todos os órgãos da parte aérea do tomateiro, principalmente as folhas, causando manchas arredondadas de coloração marrom-escura e halo amarelado. A doença pode causar abortamento de flores e os frutos podem ficar deformados quando infectados no início de seu desenvolvimento. O controle da pinta bacteriana consiste na utilização de sementes e de mudas saudáveis, cultivares resistentes à doença e pulverizações preventiva de bactericidas à base de cobre (LOPES et al., 2021).

O método de controle mais eficiente para a pinta bacteriana é a utilização de cultivares de tomateiro resistentes portadoras do gene *Pto*. A utilização de sementes e mudas saudáveis, eliminação de plantas voluntárias, irrigação adequada, rotação de culturas, eliminação de restos culturais e o controle químico com formulações à base de cobre e indutores de resistência devem ser medidas complementares no controle da doença (REIS et al., 2021, INOUE-NAGATA et al., 2016, LOPES, 2021).

O uso de produtos à base de cobre apresenta alguns problemas. A eficiência destes produtos é altamente dependente da ocorrência de chuva após a sua aplicação. Por outro lado, o uso intensivo de cúpricos pode favorecer populações resistentes ao cobre e levar ao acúmulo de altos teores do metal no solo (PERNEZNY et al., 2012;). O ativador ou indutor de resistência acibenzolar-S-metil na dose recomendada tem efeito na redução da severidade da doença (INOUE-NAGATA et al., 2016).

A utilização de microrganismos oriundos da rizosfera tornou-se uma estratégia importante para o manejo de doenças de diversas culturas (LIU et al., 2018). A capacidade de produzir compostos com ação antimicrobiana (RAO et al., 2016), capacidade de formar endósporos (PODILE; KISHORE, 2006), e produzir enzimas líticas como as quitinases e glucanases (BHATTACHARYYA; JHA, 2012)

são associadas a mecanismos de interesse presentes em rizobactérias e podem ser utilizados no controle das doenças de plantas.

Os objetivos deste estudo foram testar rizobactérias que apresentaram potencial antagônico *in vitro* contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no controle da pinta bacteriana e na promoção do crescimento inicial de plantas de tomateiro.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Origem, Manutenção e Preservação dos Isolados Bacterianos

Os isolados LAFUEL01, LAFUEL02 e LAFUEL03 foram obtidos como contaminantes em testes de confronto direto entre fungos fitopatogênicos e leveduras no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em março de 2020. Os três isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*. O genoma de LAFUEL03 foi sequenciado e identificado como *B. velezensis* (DUIN, 2022).

Os isolados de rizobactérias foram obtidos a partir de coletas de raízes e solo rizosférico de plantas da família Solanaceae em áreas do Centro de Ciências Agrárias e Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Para serem utilizadas nos experimentos, as rizobactérias foram ativadas em meio Ágar-Nutriente (AN) (28 g AN comercial; 1000 mL água destilada), a 28 °C e escuro, durante 24 h.

As bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas euvesicatoria* 75-3 IAPAR, *Ralstonia solanacearum* 10407 IAPAR, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 7716 IAPAR e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4704 IAPAR são provenientes da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia e Diagnóstico em Fitossanidade do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IAPAR/Emater) em Londrina/PR. Para uso nos experimentos, os isolados foram ativados em meio AN e incubados a 28 ± 2 °C, durante 24 h.

As bactérias foram preservadas pelo método de secagem (ROMEIRO, 2001). Os isolados foram cultivados em meio AN durante 24h e suspensas em solução salina estéril. Em erlrmeyer, foram adicionados 5 mL da suspensão de células bacterianas e 5 mL de meio peptona-gelatina (50 g L⁻¹ gelatina, 80 g L⁻¹ peptona). Em seguida, tiras de papel-filtro foram embebidas com a suspensão. As tiras de papel-filtro foram transferidas para placas de Petri e acondicionadas em dessecador, contendo sílica-gel, durante cinco dias. As tiras foram armazenadas em envelopes estéreis a 4 °C.

4.4.2 Controle da Pinta Bacteriana em Tomateiro

Os isolados LAFUEL01, 12, 24, 32, 36, 40, 43 e 85 que apresentaram potencial antagônico nos testes *in vitro* contra *P. syringae* pv. *tomato* foram selecionados para o teste de controle da pinta bacteriana em casa de vegetação.

Sementes de tomate da cultivar Santa Cruz Kada foram semeadas em bandejas contendo substrato e mantidas por 10 dias em casa-de-vegetação. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para vasos com volume de 1 L contendo substrato e mantidas em casa-de-vegetação. As plantas foram fertirrigadas a cada sete dias com solução de Hoagland (93,02 mg L⁻¹ de NO₃; 3,10 mg L⁻¹ de P; 23,46 mg L⁻¹ de K; 20,04 mg L⁻¹ de Ca; 4,86 mg L⁻¹ de Mg, 67,41 mg L⁻¹ e SO₄; 0,5 mg L⁻¹ de B; 0,1 mg L⁻¹ de Zn; 0,5 mg L⁻¹ de Mn; 0,02 mg L⁻¹ de Cu; 0,05 mg L⁻¹ de Mo; 5,0 mg L⁻¹ de Fe; 0,65 mg L⁻¹ de Cl e 2,06 mg L⁻¹ de Na).

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (Pst) foi cultivada em meio 523 sólido (10 g de sacarose + 8 g de caseína ácida hidrolizada + 4 g de extrato de levedura + 2 g de K₂HPO₄ + 0,3 g de MgSO₄.7H₂O + 15 g de ágar + 1000 mL de água destilada) durante 24 h a 28 °C e, posteriormente, as células foram suspensas em água deionizada autoclavada (concentração: O.D₆₀₀ = 0,3).

A inoculação foi realizada em plantas de tomateiro no estágio V3 por pulverização da suspensão bacteriana até o ponto de escorrimento. As plantas permaneceram em câmara úmida por 24h antes e 48h após a inoculação. Setenta e duas horas anteriores à inoculação de Pst, as plantas foram tratadas via pulverização com os seguintes tratamentos. 1) suspensão de células de LAFUEL01, 12, 24, 32, 36, 40, 43 e 85 (concentração de células: O.D.₆₀₀ = 1,0) + Pst; b) água + Pst; c) água (sem inoculação de Pst); d) oxicleto de cobre com 50% de cobre metálico (200 g 100 L⁻¹ de água deionizada autoclavada) + Pst; e) Acibenzolar-S-metil (5 g 100 L⁻¹ de água deionizada autoclavada) + Pst; . Em todos os tratamentos foi adicionada uma alíquota de adjuvante/espalhante Silwet ECO (40 mL 100 L⁻¹ de água). A aplicação dos tratamentos foi refeita a cada sete dias contando a partir da primeira aplicação.

O delineamento experimental do ensaio de controle da pinta bacteriana foi inteiramente casualizado com 8 repetições. A unidade experimental foi constituída por um vaso com uma planta.

3.4.3 Promoção do Crescimento de Tomateiro por Rizobactérias

Sementes de tomate da cultivar Santa Cruz Kada foram desinfestadas (1 min álcool 70%, 1 min em hipoclorito de sódio 1%, três enxagues em água deionizada autoclavada e secagem em papel filtro estéril em fluxo laminar). As sementes foram microbiolizadas durante quatro horas com suspensão de células dos isolados LAFUEL03, 43, 61, 66, 67, 71, 80 e 93 (concentração de células: $O.D_{600} = 1,0$) e água (controle negativo). Posteriormente, as sementes foram secas em fluxo laminar durante 12 h. Vinte e cinco sementes foram acondicionadas sobre papel filtro umedecido dentro de caixas gerbox e mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro). A primeira contagem de germinação foi realizada no quinto dia e a contagem final no décimo quarto dia (RAS, 2009). Ao final do experimento foi determinada o peso da matéria fresca e seca das plântulas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições de 50 sementes. A unidade experimental foi constituída por duas caixas gerbox com 25 sementes cada.

3.4.4 Análise Estatística

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) pelo software R.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Controle da Pinta Bacteriana em Tomateiro

O tratamento das plantas de tomateiro com os isolados LAFUEL01, 12, 32, 40, 43 e 85 diminuiu significativamente o número de lesões de pinta bacteriana em comparação ao tratamento água. Contudo, nenhum tratamento diminuiu significativamente a severidade da doença e a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) (Tabela 1).

Tabela 6 – Número de lesões, severidade final (%) e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) (%) da pinta bacteriana em tomateiro tratado com rizobactérias.

Tratamento	Nº de lesões	Severidade final (%)	AACPD
Água	80,1 a ¹	3,28 ^{NS}	2,85 ^{NS}
LAFUEL36	58,8 ab	6,14	4,28
LAFUEL24	40,1 abc	7,85	4,15
LAFUEL12	37,1 bc	7,28	3,85
LAFUEL85	31,0 bc	1,57	1,42
LAFUEL43	30,7 bc	1,57	1,28
LAFUEL32	28,2 bc	5,28	2,57
LAFUEL40	19,2 bc	5,28	2,92
LAFUEL01	19,2 bc	4,71	2,75
Cobre	0,00 c	0,00	0,00
IR	0,00 c	0,00	0,00
C.V. (%)	75,2	130,1	116,5

¹Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).^{NS}Não significativo. **Fonte:** próprio autor (2024).

Ferraz et al. (2015) testaram os metabólitos do isolado UFV-0073 no controle da pinta bacteriana por pulverização nas folhas de tomateiro. Houve redução do número de lesões de pinta-bacteriana de aproximadamente 25 para 12 lesões. Akila et al. (2024) demonstram que os metabólitos produzidos por um isolado de *B. subtilis* reduziu 41,7% a incidência de pinta bacteriana em tomateiro inoculados com o isolado Pst1 de *P. syringae* pv. *tomato*.

A capacidade de reduzir o número de lesões, principalmente, dos isolados LAFUEL01 e 40 corroboram os resultados dos ensaios *in vitro* desenvolvidos neste estudo, uma vez que estes isolados apresentaram antagonismo em cultura dupla e produção de sideróforos e biossurfactantes.

A disseminação de *P. syringae* pv. *tomato* é mais eficiente em condições de chuva e irrigação por aspersão (INOUE-NAGATA et al., 2016). Com isso, é possível relacionar a severidade entre os tratamentos com a falta de disseminação da bactéria após a inoculação, uma vez que não houve novas infecções que aumentasse a severidade da doença, deixando área foliar disponível para que as poucas lesões existentes ocupassem a mesma área em relação a tratamentos que apresentaram um maior número de lesões.

4.4.2 Promoção do Crescimento de Tomateiro por Rizobactérias

Os tratamentos com suspensão de células de LAFUEL03, 43, 61, 66, 67, 71, 80 e 93 não influenciaram a germinação e o peso da matéria fresca (PMF) das plântulas de tomateiro obtidas de sementes tratadas com as rizobactérias (Tabela 2).

Tabela 7 – Germinação aos quatorze dias (%) e peso da matéria fresca (PMF) (g) de plântulas de tomateiro obtidas de sementes tratadas com suspensão de LAFUEL03, 43, 61, 66, 67, 71, 80 e 93.

Tratamento	Germinação (%)	PMF (g)
Água	87 ^{NS}	1,30 ^{NS}
LAFUEL03	94	1,76
LAFUEL43	87	1,78
LAFUEL61	88	1,93
LAFUEL66	89	1,68
LAFUEL67	92	1,81
LAFUEL71	90	1,74
LAFUEL80	86	1,74
LAFUEL93	90	1,85
C.V. (%)	4,91	15,24

^{NS}Não significativo pelo ANOVA a 5% de probabilidade. **Fonte:** próprio autor (2024).

Embora os isolados testados no ensaio de promoção de crescimento tenham produzido AIA, é possível atribuir a ausência de promoção do crescimento das plantas inoculadas com as rizobactérias em decorrência do período de avaliação (14 dias), uma vez que os hormônios vegetais associados a germinação e produção inicial de raízes são citocinina e giberelina. Estes hormônios agem quebrando a dormência e ativam a produção de enzimas que permitem a utilização das reservas presentes nas sementes, como o amido, enquanto, as auxinas auxiliam no

desenvolvimento e alongamento da planta após a fase de germinação (GALERIANI; COSMO, 2020).

Pei et al. (2022) inocularam plantas de tomateiro com suspensão de células do isolado Oj-2.16 *Bacillus amyloliquefaciens* e observaram que 20 dias após o tratamento as plantas de tomateiro apresentaram aumento de 44,4; 122,2; 80,1; 57,6 e 64,0% na altura da planta, comprimento da raiz, largura do caule, peso fresco e peso seco, respectivamente.

Ji et al. (2021) determinaram que *B. amyloliquefaciens*, isolado Ba13, aumentou significativamente a altura e o peso fresco de plantas de tomateiro em 10,98% e 20,15%, respectivamente. Por meio da predição de genes relacionados a biossíntese de hormônios vegetais, os autores verificaram que o isolado bacteriano poderia sintetizar AIA e ao estudar o sobrenadante da cultura de Ba13 encontraram AIA na concentração de $6,68 \text{ E}^{-11} \text{ mol litro}^{-1}$. A avaliação das plantas inoculadas com rizobactérias ocorreu com cerca de 30 dias de idade, o que evidenciou o efeito da produção de AIA do isolado Ba13 em estádios fenológicos posteriores à germinação.

4.5 CONCLUSÃO

Os isolados LAFUEL01 e LAFUEL40 de rizobactérias foram capazes de diminuir em cerca de 76% o número de lesões em comparação ao tratamento controle (água). A inoculação das rizobactérias não promoveu o crescimento de plântulas de tomateiro com 14 dias de idade. Neste sentido, é possível que uma avaliação muito precoce das plantas tenha contribuído para não evidenciar uma promoção de crescimento pelo AIA eventualmente produzido pelas rizobactérias testadas, sendo necessário investigar se as características observadas *in vitro* promoverão o crescimento do tomateiro em estádios mais avançados de seu desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- AGRINUAL. Anuário da agricultura brasileira. **São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos**, 2020.
- AGRIOS, G. N. Plant Patology. Ed. 5, **Burlington**, Elsevier Academic Press, 2005.
- AKILA, A. H.; ALI, M. A. S.; KHAIRY, A. M.; ALNAHAL, A. S. M.; ALFASSAM, H. E.; RUDAYANI, H. A.; JABER, F. A.; TOHAME, M. R. A. Biological Control of Tomato Bacterial Leaf Spots and Its Impact on Some Antioxidant Enzymes, Phenolic Compounds, and Pigment Content. **Biology**, v. 13, 2024.
- ALAMER, I. S. A.; TOMAH, A. A.; LI, B.; ZHAN, J. Isolation, Identification and Characterization of Rhizobacteria Strains for Biological Control of Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) of Eggplant in China. **Agriculture**, v. 10, p. 37, 2020. <https://doi.org/10.3390/agriculture10020037>.
- ALMEIDA, L. K. B. Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 740–755, 2016.
- ALMEIDA, V. S.; SILVA, D.J.H.; GOMES, C.N. Sistema Viçosa para o cultivo de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.33, n.1, p.74-79, 2015.
- ALOO, B. N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA, E. R. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v. 219, p. 26-39, 2019.
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. Editora universitária de lavras, 2013.
- ANDRADE, J. C.; DELIZA, R.; YAMADA, E. A.; GALVÃO, M. T. E. L.; FREWER, L. J.; BARAQUET, N. J. Percepção do consumidor frente aos riscos associados aos alimentos, sua segurança e rastreabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 16, n. 3. p. 184-191, 2013.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, p.1559-1570, 2010.
- BAUTISTA, L. X. C.; GALLARDO, I. R. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) em cultivos microbianos. **Pontificia Universidad Javeriana**, Bogotá, p 117, 2008.
- BERTOGLIO, C., MOURA DUIN, I., BERTÊ, R.; TEIXEIRA, G. M.; OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, R. P. L.; BALBI-PEÑA, M. I. Activity of *Brevi bacillus brevis* strain LABIM17 against *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and control of bacterial spot of tomato. **J Plant Dis Prot**, v. 130, p.921–927, 2023. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00738-4>
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,

Oxford, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BIBI, A.; BIBI, S.; AL-GHOUTI, M. A.; ABU-DIEYEH, M. H. Isolation and evaluation of Qatari soil rhizobacteria for antagonistic potential against phytopathogens and growth promotion in tomato plants. *Scientific Reports*, v. 13, 2023.

BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. de N.; GIORDANO, L. B.; MELO, P. C. T. Melhoramento genético. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, p.17-27, 2012.

CABI. Invasive Species Compendium. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial canker of tomato).

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE F. D. **Microrbiologia do Solo**. Segunda Edição. São Paulo, ESALQ/USP, 2016.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; BRAGA JUNIOR, G. M.; LIMA, C. A.; MARTINS, A. L. L.; SOUZA, M. C.; CHAGAS, L. F. B. *Bacillus subtilis* como inoculante promotor de crescimento vegetal em soja. v. 7 n.1. **Universidade Estadual de Alagoas**, Uenal, Brasil, 2022.

CHOI, T. G.; MAUNG, C. E. H.; LEE, D. R.; HENRY, A. B.; LEE, Y. S.; KIM, K. Y. Role of bacterial antagonists of fungal pathogens, *Bacillus thuringiensis* KYC and *Bacillus velezensis* CE 100 in control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and subsequent growth promotion of tomato. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1765980>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. **Compêndio de Estudos Conab**, v. 21, Brasília, 2019.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **Saint Paul: APS Press**, 1983.

DE MELO, I. S. Rizobactérias. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/controle-alternativo/rizobacterias>. Acessado em: 28 jan. de 2024.

DE PAULA, G. F.; DEMÉTRIO, G. B.; MATSUMOTO, L. S. BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF SOYBEAN PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. *Agronomy*, **Rev. Caatinga**, v. 34, 2021.

DHOUB, H.; ZOUARI, I.; ABDALLAH, D.; B.; BELBAHRI, L.; TAKTAK, W.; TRIKI, M. A.; TOUNSI, S. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. **Biological Control**, v. 139, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104092>

DOS SANTOS, P. S. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.

DUCA, D. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. Antonie vanLeeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.106, n. 1, p. 85–125, 2014.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Ácido indol-3-acético em interações planta-micróbio. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 85-125, 2014.

DUIN, I.M. Análise genômica e controle biológico de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* agente causal da estria bacteriana do milho. **Tese de Doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, 2022.

ELSER, J. J. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. **EcologyLetters**, v. 10, n. 12, p. 1135–1142, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. A cultura do tomate. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas/tomate-de-mesa/cultivares2>. Acesso em: 21jul. 2022.

FAN, B., CHEN, X. H., BUDIHARJO, A., BLEISS, W., VATER, J., AND BORRIS, R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **J. Biotechnol.**, v. 151, p. 303–311, 2011

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data> Acesso em 27 jul 2023.

FARZAND, A.; MOOSA, A.; ZUBAIR, M.; KHAN, A. R.; AYAZ, M.; VENANCE, C. M.; GAO, X. Transcriptional Profiling of Diffusible Lipopeptides and Fungal Virulence Genes During *Bacillus amyloliquefaciens* EZ1509-Mediated Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 110, v. 2, p. 317-326, 2020.

FELIPE, V.; BRANCO, M. I.; TERRESTRE, M.; MIELNICHUCK, N.; ROMERO, A. M.; YARYURA, P. M. Biocontrol of tomato bacterial spot by novel *Bacillus* and *Pseudomonas* strains. **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 935–948, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02297-6>

FERRAZ, H.; MILAGRES, E. A.; MOREIRA, P. C.; ROMEIRO, R. S.; Métodos de dispensa do antagonista *Pseudomonas putida* (UFV-0073) no biocontrole da mancha-bacteriana e pinta-bacteriana do tomateiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, 2015.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*, v. 682, p. 779-799, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>

FIGUEREDO, M. V. B., SELDIN, L., ARAUJO F. F.; MARIANO, R. L. R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.) **Plant growth and health promoting bacteria**. 1ª ed. Berlin: Springer-Verlag, v.18,

p.45-68, 2010.

FIRA, D., DIMKIĆ, I., BERIĆ, T., LOZO, J., STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**. v.285, p.44-55, 2018.

FIUZA, D. A. F.; VITORINO, L. C.; SILVA, C. F.; TROMBELA, N. T. S.; BESSA, L. A.; SOUCHIE, E. L. Plant growth-promoting rhizobacteria isolated from cultivated soils using *Glycine max* L. plants as bait. **Crop production, Cienc. Rural**, v. 54, 2024.

GALERIANI, T. M.; COSMO, B. M. N. Noções de fisiologia vegetal: germinação, transpiração, fotossíntese e respiração celular. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2020.

GALPERIN, M. Y. Genome diversity of spore-forming Firmicutes. **Microbiology Spectrum**, v. 1, p. 1-15, 2013.

GAO, S.; WU, H.; YU, X.; QIAN, L.; GAO, X. Swarming motility plays the major in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. **Biological Control**, Estados Unidos, v.98, p.11-17, 2016.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. An overview of the road map to the manual. **SystematicBacteriology**. 2.ed. New York: Springer, p. 20, 2000.

GAUTAM, S.; CHAUHAN, A.; SHARMA, R.; SEHGAL, R.; SHIRKOT, C. K. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Microb. Pathog**, v. 130, p. 196–203, 2019.

GULERIA, S.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C.K. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. **Int. J. Food Microbiol**, v. 232, p. 134–143, 2016.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SHARMA, S.; ALZHRANI, O. M.; NOURELDEEN, A.; DARWISH, H. Identification, characterization and optimization of phosphate solubilizing rhizobacteria (PSRB) from rice rhizosphere. **Saudi J Biol Sci**, v. 29 p. 35–42, 2022.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 29, p.65–87, 1991. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>.

HERNÁNDEZ, J.; TAMEZ, P.; GOMEZ, R.; CARMEN, M. E.; GARCÍA, M. S.; ROBIES, L. INFANTE, R. Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* (formally *X. perforans*) associated with bacterial spot severity in *Capsicum annuum* crops in South Central Chihuahua, Mexico. **PeerJ**, v. 9, 2021.

HOSSAIN, M. F.; BILLAH, M.; ALI, M. R.; PARVER, M. S. A.; ZAOTI, Z. F.; HASAN, S. M. Z.; HASAN, M. F.; DUTTA, A. K.; KHALEKUZZAMAN, M.; ISLAM, M. A.; SIKDAR, B. Molecular identification and biological control of *Ralstonia solanacearum* from wilt of papaya by natural compounds and *Bacillus subtilis*: An integrated

experimental and computational study. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 6972-6986, 2021.

HUO, Y.; KANG, J. P.; AHN, J. C.; KIM, Y. J.; PIAO, C. H.; YANG, D. U.; YANG, D. C. Siderophore-producing rhizobacteria reduce heavy metal-induced oxidative stress in *Panax ginseng* Meyer. *Journal of Ginseng Research*, v. 45, p. 218-227, 2021.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção de tomate no Brasil. 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br>. Acessado em: 25 jan. de 2024.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>. Acesso em: 27 jul. 2023.

IM, S. M.; YU, N. H.; JOEN, H. W.; KIM, S. O.; PARK, H. W.; PARK, A. R.; KIM, J. C. Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 130-137, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.007>

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZEDO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do Tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. Ouro Fino – MG, v. 2, ed. 5, p. 697-731, 2016.

IQBAL, M.; WAGI, S.; AHMED, A. Phyllospheric Bacterial Treatments Improve Growth in *Helianthus annuus* L. **RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 30–40, 2018.

JI, C.L.; ZHANG, M.L.; KONG, Z.R.; CHEN, X.; WANG, X.; DING, W.; LAI, H.X.; GUO, Q. Genomic analysis reveals potential mechanisms underlying promotion of tomato plant growth and antagonism of soilborne pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13. **Microbiol. Spectr.**, v. 9, 2021.

JIANG, Z. F.; LIU, D. D.; WANG, T. Q.; LIANG, X. L.; CUI, Y. H.; LIU, Z. HUA; L.; WEN B. Concentration difference of auxin involved in stem development in soybean. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 19, n. 4, p. 953–964, 2020.

JÚNIOR, N. S. M. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5 ed, Ouro Fino – MG: Agronômica Ceres, 2018.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability

by of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and non rhizosphere soil. **Can. J. Microbiol.**, v. 5, p. 79-85, 1959.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v. 44, p. 693–695, 1954.

KONAPPA, N.; KRISHNAMURTHY, S.; ARAKERE, U.C. Efficacy of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria and *Trichoderma* strains in eliciting resistance against bacterial wilt in a tomato. **Egypt J Biol Pest Control**, v.30, n. 106, 2020. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00303-3>

KONAPPA, N.; KRISHNAMURTHY, S.; SIDDAIAH, C. N.; RAMACHANDRAPPA, N. S. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, 2018. DOI:10.1186/s41938-018-0069-5

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v. 4, n.2, p.12., 2010.

LE, K. D.; KIM, J.; YU, N. H.; KIM, B.; LEE, C. W.; KIM, J. C. Biological Control of Tomato Bacterial Wilt, Kimchi Cabbage Soft Rot, and Red Pepper Bacterial Leaf Spot Using *Paenibacillus elgii* JCK-5075. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00775>

LING, L.; HAN, X.; LI, X.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; CAO, P.; WU, Y.; WANG, X.; ZHAO, J.; XIANG, W. A *Streptomyces* sp. NEAU-HV9: Isolation, Identification, and Potential as a Biocontrol Agent against *Ralstonia solanacearum* of Tomato Plants. **Microorganisms**, v. 8, 2020. Doi: 10.3390/microorganisms8030351.

LOPES, C. A. Cancro bacteriano do tomateiro. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2017.

LOPES, C. A.; QUEZEDO-DUVAL, A. M. Doenças causadas por bactérias. In: REIS, A. **Doenças do tomateiro**. Embrapa Hortaliças, ed. 3, p. 73-102, 2021.

LOPES, C. A; MENDONÇA, J. L. Enxertia em tomateiro para controla da murcha-bacteriana. **Circular técnica**, Brasília, DF, 2014.

MALAVOLTA, V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v.34, p. 9-88, 2008.

MALAVOLTA, V.J.; RODRIGUES NETO, J. Controle de doenças causadas por bactérias em 13 tomateiro. In: **Encontro Nacional de Produção e Abastecimento de Tomateiro**, 2. 1991, 14 Jaboticabal: FUNEP, p. 166-182, 1991.

MARTINS, P. H. R.; SILVA, L. P.; OREM, J. C.; MAGALHÃES, M. I. A. de; CAVALCANTE, D. A.; DE-SOUZA, M. T. Proteinprofiling as a tool for identifying environmental aerobic endospore-forming bacteria. **Open J Bac**, v. 4, p. 001-007, 2020. DOI. <https://dx.doi.org/10.17352/ojb.000012>

MASOOD, S.; ZHAO, X. Q.; SHEN, R. F. *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. **Scientia Horticulturae**, v. 272, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109581>

MATSUDA, R. Production of indoleacetic acid by strains of the epiphytic bacteria *Neptunomonas* spp. isolated from the red alga *Pyropia yezoensis* and the seagrass *Zostera marina*. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 2, p. 255–265, 2018.

MCCARTER, L. L.; MORABE, M. L. SWIMMING AND SWARMING MOTILITY. In: ROITBERG, B. D.; COTTER, P. D. **Reference Module in Life Sciences**, Netherlands v.1, p.1-9, 2019.

MEDEIROS, F. H. V.; DA SILVA, J. C. P.; PASCJOLATI, S. F. Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. Ouro Fino – MG, ed. 5, v.1, p. 261-274, 2018.

MELO, I. S. **Rizobactérias**. Embrapa Meio Ambiente, 22 de dezembro de 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/controle-alternativo/rizobacterias>

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 1037, 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Consulta de Produtos Formulados. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 15 set. 2023.

MORALES-CEDENO, L. R., OROZCO-MOSQUEDA, M. C., LOEZA-LARA, P. D. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>

NAIKA, S.; JEUDE, J. V.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. V. A cultura do tomate produção, processamento e comercialização. 1. ed. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, p.104, 2006.

NASCIMENTO, A. R.; FERNANDES, P. M.; BORGES, L. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**. Goiânia. v.31 p. 15-24, 2013.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plantgrowth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n. 11, p. 1–16, 2017.

OREM, J. C.; SILVA, W. M. C.; RAIOL, T.; MAGALHÃES, M. I. A.; MARTINS, P. H. R.; CAVALCANTE, D.A.; KRUGER, R. H.; BRIGIDO, M.M.; DE-SOUZA, M. T. Diversidade filogenética de *Bacillalles* formadores de esporos aeróbicos isolados de

solos brasileiros. **International Microbiology**, v. 22, p. 511–520, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00080-6>

PAULA, M. F. P.; BABA, V. Y.; THOMÉ, R. M.; DUIN, I. M.; CARDOSO, F. M.; BALBI-PEÑA, M. I. (b). Atividade antagônica de *Bacillus* sp. (LAFUEL03) contra isolados de *Pantoea ananatis*. **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, online, 2021.

PAULA, M. F. P.; PADUAN, F. N.; DANTAS, B. C.; THOMÉ, R. M.; BALBI-PEÑA, M. I.; Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelas cepas LAFUEL01, LAFUEL02 e LAFUEL03 de *Bacillus* sp. **Anais do IX Simpósio de Atualização em Ciências Agronômicas**, Londrina, 2022.

PAULA, M. F. P.; THOMÉ, R. M.; CARDOSO, F. M.; DUIN, I. M.; BABA, V. Y.; BALBI-PEÑA, M. I. (a). Controle in vitro de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por *Bacillus* sp. (LAFUEL03). **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, online, 2021.

PEI, G.; ZHANG, Q.; ZHU, X.; ZHANG, L. Biological Control of Verticillium Wilt and Growth Promotion in Tomato by Rhizospheric Soil-Derived *Bacillus amyloliquefaciens* Oj-2.16. **Pathogens**, v. 12, p. 37, 2022.

PÉREZ-FUENTES, C.; RAVANAL, M. C.; EYZAGUIRRE, J. Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* pectin lyase in *Pichia pastoris* and its characterization. **Fungal biology**, v. 118, n. 5-6, p. 507-515, 2014.

PERNEZNY, K.; DAVIS, R. M.; MOMOL, T. Management of important bacterial diseases. In DAVIS, R. M. K.; PERNEZNY, J. C. Tomato health management **American Phytopathological Society**, ed. 1, pp. 103-112, 2012.

PIETRARELLI, L.; VARVARO, L. Effects of simulated rain of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on tomato plants. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, p. 245-251, 2006.

PINHO, C. R. S.; CANABARRO, P. B.; REY, R. K. R.; BOLACEL, A. R.; ALMEIDA, A. C.; DUARTE, B. M. Rizobactérias no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, e efeitos no desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja. **Colloquium Agrariae**, v. 16, p. 110, 2020.

Planas, A. Bacterial 1,3–1,4-beta-glucanases: Structure, function and protein engineering. Biochim. Biophys. **Acta Protein Struct. Molec. Enzyme**, p. 361–382, 200.

PODILE, A. R.; KISHORE, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). Plant associated bacteria. Netherlands: **Springer**, p. 195-230, 2006.

PORFÍRIO, S. G. S.; MARCO D. R.; PEIXE, A.; CABRITA, M. J.; AZADI, P. Current analytical methods for plant auxin quantification - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 902, p. 8–21, 2016.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Doenças bacterianas. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**, p 203-222. Brasília: Embrapa, 2012.

RAS – Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009.

RASHAD, Y. M.; ABBAS, M. A.; SOLIMAN, H. M.; ABDEL-FATTAH, G.; ABDEL-FATTAH, G. Synergy between endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* GGA and arbuscular mycorrhizal fungi induces plant defense responses against white rot of garlic and improves host plant growth. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 59, n. 1, 2020.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from bacteria to human: Properties, applications, and future perspectives. **Enzyme Res.**, n. 791907, 2015.

REIS, A.; LOURENÇO JR, V.; LOPES, C. A. Doenças causadas por fungos e oomicetos. In: REIS, A. **Doenças do tomateiro**. Embrapa Hortaliças, ed. 3, p. 23-101, 2017.

RENEWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potencial biocontrol agents o *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathol**, v. 40: p. 524–532, 1991.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: UFV, p. 87-96, 2001.

SAMPATHKUMAR, A.; AIYANATHAN, E. A.; NAKKEERAN, S. M. Multifaceted *Bacillus* spp. for the management of cotton bacterial blight caused by *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*. **Biological Control**, v. 177, 2023.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legumeplants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.

SARITA, S. Diversity of nifH gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, v. 94, n. 1, p. 109–115, 2008.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**. v.20, p.202-205, 1995.

SCHWANTES-CEZARIO, N.; MEDEIROS, L. P.; DE OLIVEIRA, A. G.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; TORALLES, B. M. Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.123, p. 200-205, 2017.

SELEIM, M. A. A.; BEREIKA, M. F. F.; IBRAHIM, O. H. M.; ALQUBAIE, A. I.; ABO-ELYOUSR, K. A. M. Effectiveness of *Bacillus cereus* in controlling potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*: greenhouse and field studies with insights into resistance-related enzymes in potatoes. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 131, p. 65–75, 2024.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, p. 446-459, 2017. DOI: 10.1080/13102818.2017.1286950

SILVA, J. B. C. **Cultivo de tomate para industrialização**. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF: 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustri>. Acesso em: 18 de jan. 2024.

SIMONTON, T. E., ROBINSON, D., GILLARD, C., JORDAN, K.; TRUEMAN, C. L. Transmission of *Xanthomonas gardneri* to tomato seedlings during transportation and transplanting. **Crop Protection**, ed. 141, 2021.

SINGH, H. B.; KESWANI, C.; REDDY, M. S.; SANSINENEA, E.; GARCÍA-ESTRADA, C. Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms (Discovery and Applications). In: **Bacillus spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria**, p. 225–237, 2019.

SMITH, E. W. 1896. A Bacterial disease of the Tomato, Eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.) U. S. **Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology**. Bulletin 12, p. 1-28.

SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of Agrarian Science**, Tbilisi, v. 16, n. 4, p. 458–463, 2018.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de Horticultura Orgânica**. Viçosa, MG: Ed. Aprenda Fácil, p. 841, 2014.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 401–419, 2015.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.

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

STEVENS, M. A. Introduction. In: DAVIS, R.M.; PERNEZNY, K.; BROOME, J.C. **Tomato Health Management**. (ed.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 1-12, 2012.

SURESH, P.; VARATHRAJU, G.; SHANAMUGAIAH, V.; ALMAARY, K. S.; ELBADAWI, Y. B.; MUBARAK, A. Partial purification and characterization of 2, 4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 against bacterial wilt disease of tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 2155-2167, 2021.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and

characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 1–9, 2014.

TEIXEIRA, G. M.; MOSELA, M.; NICOLETTO, M. A.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M.; YOUSSEF, K.; HIGASHI, A. Y.; MIAN, S.; FERREIRA, A. S.; GONÇALVES, L. S. A.; PEREIRA, U. P.; OLIVEIRA, A. G. Genomic Insights Into the Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. **Front. Microbiol.**, v. 11, 2021.

TORTORA, M. L., DIAZ-RICCI, J. C., PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v.193, p.275–286, 2011.

VANEGAS, N. F. G.; MORENO, S. M. M.; HURTADO, B. E. P.; AFANADOR, J. G. M.; AGUIERRE, N. C.; FRANCO, G. M. R. Antagonismo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal contra el agente causal de la marchitez vascular del tomate. **Revista Colombiana de Biotecnología: Colombian Journal of Biotechnology**, v. 22, 2020.

VEJAN, P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. **Molecules, Basel**, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

VILELA, N.J.; DE MELO, P. C. T.; BOITEUX, L. S.; CLEMENTE, F.M.V.T. Perfil socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**, p. 17-27. Brasília: Embrapa, 2012.

WEIKERT, T.; NIEHUES, A.; CORD-LANDWEHR, S.; HELLMANN, M. J.; MOERSCHBACHER, B. M. Reassessment of chitosanase substrate specificities and classification. **Nat. Commun**, v. 8, n. 1698, 2017.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 697-703, 1991.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIKU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* Gen. Nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, With the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes, 1981) Comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; YOSHIMASA, K.; YANO, I.; HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia solanacearum* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni e Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) comb. nov., & *Ralstonia eutropho* (Davis, 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

YOO, S. J.; SHIN, D. J.; WON, H. Y.; SONG, J.; SANG, M. K. *Aspergillus terreus* JF27 Promotes the Growth of Tomato Plants and Induces Resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Mycobiology**, v. 46, p. 147-153, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1475370>

ZALUGA, J.; STRAGIER, P.; VAERENBERGH, V.J.; MAES, M.; DEVOS, P. Multilocus variable-number-tandem-repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. **BMC microbiology**, v. 13, p. 1-15, 2013.

ZAREI, M.; ABADI, V.A.; MORIDI, A. Comparison of vermiwash and vermicompost tea properties produced from different organic beds under greenhouse conditions. **Inter J Recy Org Waste Agric**, v. 7, p. 25-32, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40093-017-0186-2>

ZEILINGER, S. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n.2, p. 74-90, 2016.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; LIANG, F.; MA, Y.; WU, X. An Extract Produced by *Bacillus* sp. BR3 Influences the Function of the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Frontiers in Microbiology**, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02005>