



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – POSAGRO

AVELINE DE PAULA KUYAT MATES

**MECANISMOS DE CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO
EXERCIDOS POR RIZOBACTÉRIAS**

Boa Vista, RR

2017

AVELINE DE PAULA KUYAT MATES

**MECANISMOS DE CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO
EXERCIDOS POR RIZOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em produção vegetal, da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Coorientador: Dr. Daniel Augusto Schurt

Coorientador: Dr. Nadson de Carvalho Pontes

Boa Vista, RR

2017

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

M425m Mates, Aveline de Paula Kuyat.

Mecanismos de controle da mancha bacteriana do tomateiro
exercidos por rizobactérias / Aveline de Paula Kuyat Mates, 2017.
54 f. : il.

Orientador: Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira.

Coorientador: Dr. Daniel Augusto Schurt.

Coorientador: Dr. Nadson de Carvalho Pontes.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Agronomia. Universidade Federal de Roraima.

I – Tomate. 2 – Controle biológico. 3 – Rizobactérias. I –
Título. II – Vieira, Bernardo de Almeida Halfeld (orientador). III –
Schurt, Daniel Augusto (coorientador). IV – Pontes, Nadson de
Carvalho (coorientador).

CDU – 632.1

AVELINE DE PAULA KUYAT MATES

MECANISMOS DE CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO
EXERCIDOS POR RIZOBACTÉRIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em
parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Produção Vegetal.

Aprovada: 20 de fevereiro de 2017.



Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
Orientador – Embrapa Meio Ambiente



Dr. Nadson de Carvalho Pontes
IF Goiano



Dr. Daniel Augusto Schurt
Embrapa Roraima



Dra. Carine Rezende Cardoso
Laboratório Farroupilha

A Deus senhor e autor da minha vida.
À minha mãe, quem me ensinou o caminho que seguir.
Aos meus irmãos pelo amor e companheirismo.
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus por me capacitar e por estar sempre ao meu lado.

A minha mãe Débora de Paula Kuyat, por todo o tempo dedicado e pelo incentivo ao estudo.

Aos meus irmãos, Paulo Júnior Kuyat Mates, Maloni Kuyat Mates, Adriana Magalhães, Eliane Campos, Elaine Campos e Adauto Campos, pelo companheirismo e pelo apoio.

A todos os meus familiares.

Aos pesquisadores Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, Dr. Daniel Augusto Schurt e Dr. Nadson de Carvalho Pontes, pela orientação e contribuição para a elaboração desse trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, Giovanni Ribeiro de Souza e aos técnicos e a auxiliar de limpeza do laboratório de entomologia e fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente por todo o apoio.

A empresa Grupo Farroupilha pela confiança ao ceder os isolados de bactérias que fizeram parte dos estudos.

Aos meus amigos, Débora Piau, Vladimir Vieira, Regina Latarro, Rose Fonseca, Wagner Fonseca, Ademilde Sampaio, Patrícia Paes, Edi Santos, Daniela Ciricio, Caroline Moura, Sara Souza, Pammela Conceição, Ana Paula Tupinambá, Leonara Vasconcelos, João Vasconcelos, Maria do Rosário Vasconcelos, Gustavo Temple, Gabriela Sachi, Nina Roulet, Simone da Rosa Fortunato, Aline Walker e Daniel Seabra.

Aos colegas do mestrado pelo apoio.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que o objetivo de conclusão deste trabalho fosse alcançado.

Aos docentes da POSAGRO, pelos ensinamentos concebidos.

A Universidade Federal de Roraima, Embrapa Roraima e Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de realização deste curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

AVELINE DE PAULA KUYAT MATES, filha de Paulo de Araújo Mates e Débora de Paula Kuyat, nasceu em 13 de janeiro de 1990 na cidade de Matupá, Mato Grosso. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Albert Einstein em 2008. Ingressou no Curso de Agronomia em 2010, e o concluiu em 2014. De 2011 a 2014 foi bolsista PIBIC- CNPq na área de Plantas daninhas e Fitopatologia, em 2012 fez estágio curricular na Embrapa Roraima na área de pós-colheita. Em 2015 iniciou o Mestrado em Agronomia, do Programa de Pós-Graduação, área de concentração Produção Vegetal, da Universidade Federal de Roraima-UFRR, e o concluiu em 2017.

Disse Deus: "Eis que dou a vocês todas as plantas que nascem em toda a terra e produzem sementes, e todas as árvores que dão frutos com sementes. Elas servirão de alimento para vocês".

Gênesis 1:29

MATES, Aveline de Paula Kuyat. **Mecanismos de controle da mancha bacteriana do tomateiro exercidos por rizobactérias** 2017. 54 p. Dissertação de Mestrado em Agronomia- Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2017.

RESUMO

O cultivo do tomate e seu processamento estão concentrados no Sudeste, Centro-oeste e Nordeste. Dentre as doenças que acometem a tomaticultura nacional, a mancha bacteriana é uma das mais importantes. A mancha bacteriana é causada por quatro diferentes espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*. Seu controle é difícil, havendo perspectivas do uso de microrganismos antagonistas, já que medidas convencionais não apresentam eficiência satisfatória. O uso de bactérias do gênero *Bacillus* spp. e gêneros relacionados é uma das alternativas viáveis no controle de doenças e na redução ou substituição do uso de defensivos químicos no controle de doenças de plantas. Diante disso o objetivo do trabalho foi definir por quais meios, os isolados previamente selecionados de *Thiobacillus* sp. e *Bacillus* spp., promovem o controle da mancha bacteriana do tomateiro. Foram testados 7 isolados de *Bacillus* spp. e 1 isolado *Thiobacillus* sp. previamente selecionados. Os isolados GF193, GF203, GF264, GF267, GF271, GF434, GF435 e GF451 foram submetidos a ensaios com fontes únicas de carbono para verificação de sobreposição de nicho, antibiose por difusão em meio de cultura, produção de sideróforos, influência nos níveis de severidade, teor de clorofila e na atividade da enzima peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO) na planta. Nos ensaios *in vitro*, os isolados GF203, GF264, GF267 e GF451 inibiram o desenvolvimento de *X. perforans* por antibiose. Os isolados GF193, GF203, GF264, GF267, GF271, GF435 e GF451 foram capazes de produzir sideróforos. O isolado GF267 foi capaz de competir por fontes carbonos contra *X. perforans*. No ensaio *in vivo*, o isolado GF267 foi o mais eficiente em reduzir a severidade da mancha bacteriana quando dispensado em folhas e raízes das plantas. As atividades da PO e PPO foram maiores aos 3 e 5 dias após a inoculação do patógeno para plantas com aplicação de GF267, evidenciando que este é capaz de induzir resistência sistêmica em tomateiro. O antagonista também foi capaz de aumentar o teor de clorofila nas plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento da doença quando dispensado via solo. Conclui-se que GF267 (*B. methylotrophicus*) foi o mais promissor, atuando no controle da mancha bacteriana do tomateiro por meio de antagonismo direto e indução de resistência.

Palavras chave: Controle biológico. *Solanum lycopersicum*. *Xanthomonas perforans*.

MATES, Aveline de Paula Kuyat. **Control mechanisms of bacterial spot of the tomato exerted by rhizobacteria** 2017. 54 p. M. S. Dissertation in agronomy-Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2017.

ABSTRACT

Tomato cultivation and processing is concentrated in the Southeast, Midwest and Northeast Brazilian states. Among diseases that affect the culture, the bacterial spot is one of the most important. The bacterial spot is caused by four different species of bacteria belonging to *Xanthomonas*. Its control is difficult, with perspectives of the use of antagonistic microorganisms, since conventional control measurements do not present satisfactory efficiency. The use of bacteria of the genus *Bacillus* spp. is one of the viable alternatives in the control of diseases and in the reduction or substitution of the use of agrochemical products in the control of plant diseases. Therefore, the objective of this research was to define by the capability and the mechanisms that previously selected isolates of *Thiobacillus* sp. and *Bacillus* spp. promote the control of the bacterial spot of the tomato. Seven previously selected isolates of *Bacillus* spp. and one isolate *Thiobacillus* sp. (GF193, GF264, GF267, GF267, GF271, GF434, GF435, and GF451) were tested with single carbon sources to verify niche overlap, antibiosis, siderophore production, capability to control the bacterial spot, enhancement of the chlorophyll content, and resistance induction. On *in vitro* assays, the isolates GF203, GF264, GF267 and GF451 inhibited the development of *X. perforans*. Isolates GF193, GF203, GF264, GF267, GF271, GF435 and GF451 were able to produce siderophores. The GF267 isolate was able to compete for carbon sources against *X. perforans*. On *in vivo* assays, the GF267 isolate was the most efficient in reducing the severity of bacterial blight both dispensed on leaves and plant roots. The peroxidase and polyphenoloxidase activities of were increased at 3 and 5 days after inoculation of the pathogen on plants with application of GF267, evidencing this strain is able to induce systemic resistance in tomato. The antagonist was also able to increase the chlorophyll content on plants in the initial disease development period by root colonization. It was concluded that GF267 (*B. methylotrophicus*) was the most promising strain on the control of the bacterial spot of the tomato by direct antagonism and resistance induction.

Key words: Biological control. *Solanum lycopersicum*. *Xanthomonas perforans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>B. methylotrophicus</i> inoculados em raízes de tomates. Aplicação do isolado nas raízes das plantas	26
Figura 2. Severidade aos 18 dias após a inoculação com <i>X. perforans</i> (A) e AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença) em plantas de tomateiro	28
Figura 3. Antibiose dos isolados de <i>Thiobacillus</i> sp. e <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Xanthomonas perforans</i>	29
Figura 4. Crescimento de <i>X. perforans</i> em meio líquido quando crescida concomitantemente com o isolado de <i>B. methylotrophicus</i> ou na ausência deste	30
Figura 5. Placas de Petri contendo meio CAS agar, mostrando a produção de sideróforo por <i>Bacillus</i> spp	33
Figura 6. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro aos 7 dias após colonização da rizosfera com <i>B. methylotrophicus</i> e 5 dias após a inoculação com <i>X. perforans</i>	34
Figura 7. Severidade da mancha bacteriana do tomateiro em plantas com raiz colonizada por <i>B. methylotrophicus</i> e inoculadas com <i>X. perforans</i> (B+Xp) e somente inoculadas com <i>X. perforans</i> (Xp)	35
Figura 8. Teor de clorofila (unidades SPAD) em folhas de tomate inoculadas com <i>X. perforans</i> (X.P), <i>B. methylotrophicus</i> + <i>X. perforans</i> (B+X.p), <i>B. methylotrophicus</i> (<i>Bacillus</i>) e Testemunha (Test.)	36
Figura 9. Atividade da peroxidase em folhas de tomateiro que receberam alíquota de água no solo (T), suspensão de <i>B. methylotrophicus</i> no solo seguido de inoculação com <i>X. perforans</i> na parte aérea 72 h após a colonização (B+Xp)	37
Figura 10. Atividade da polifenoloxidase em folhas de tomateiro que receberam alíquota de água no solo (T), suspensão de <i>B. methylotrophicus</i> no solo seguido de inoculação com <i>X. perforans</i> na parte aérea 72 h após a colonização (B+Xp)	39
Figura 11. Concentração de proteínas em folhas de tomateiro que receberam alíquota de água no solo (T), suspensão de <i>B. methylotrophicus</i> no solo seguido de inoculação com <i>X. perforans</i> na parte aérea 72 h após a colonização (B+Xp)	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -Índices de sobreposição de nicho (NOI) dos isolados *B. methylotrophicus* e *X. perforans*.
..... 32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral:	15
2.2 Objetivos Específicos:	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 A cultura do tomate	16
3.2 Perdas na Produção de Hortaliças por Doenças Bacterianas	16
3.3 Mancha Bacteriana	17
3.4 Controle Biológico	19
3.5 Seleção de <i>Bacillus</i> spp. com capacidade de biocontrole <i>in vivo</i> e características de antagonismo <i>in vitro</i> .	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro e teor de clorofila em função da aplicação de <i>B. methylotrophicus</i> no filoplano	22
4.2 Antibiose por difusão em dupla camada	23
4.3 Produção de sideróforos	23
4.4 Seleção de estirpe tolerante de <i>X. perforans</i> resistente à rifampicina	23
4.4.1 Dinâmica do antagonismo entre <i>B. methylotrophicus</i> e <i>X. perforans</i> em meio líquido	24
4.5 Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono	24
4.6 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro e teor de clorofila em função da aplicação de <i>B. methylotrophicus</i> na rizosfera	25
4.7 Capacidade de <i>B. methylotrophicus</i> em induzir resistência	25
4.7 Obtenção dos Extratos	26
4.8 Determinação da atividade de peroxidase, polifenoloxidase e proteína total	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro em função da aplicação de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Thiobacillus</i> sp. em filoplano	27
5.2 Antibiose por difusão em dupla camada e em meio líquido	28
5.3 Capacidade de Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono	31
5.4 Produção de sideróforos	32
5.5 Teor de clorofila e severidade da mancha bacteriana do tomateiro em função da aplicação de <i>B. methylotrophicus</i> em rizosfera	34
5.6 Indução de Resistência	37
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), é uma cultura cultivada amplamente no Brasil e no mundo e é originário da espécie andina *S. lycopersicum* variedade *cerasiforme*, que produz fruto do tipo cereja (QUEZADO-DUVAL et al., 2004; ARAÚJO et al., 2016).

Entre as principais hortaliças produzidas no país, o tomate vem se destacando ao longo dos anos. Em março de 2016 a produção ultrapassou 3,5 milhões de toneladas com produtividade média de 64 toneladas/ha e área plantada de 56 mil ha (IBGE, 2016). Dentre as doenças que incidem na cultura, a mancha bacteriana é uma das mais importantes, principalmente para o segmento de processamento industrial. Esta doença é causada por 4 diferentes espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*, sendo as mais predominantes no Brasil as espécies *X. perforans* e *X. gardneri* (ARAÚJO et al., 2011).

A mancha bacteriana é de difícil controle e alguns fatores contribuem para isso, tais como: eficiência variável do controle químico, com poucos produtos registrados para esse fim; indisponibilidade de cultivares com resistência à doença; rápida disseminação nas lavouras em condições favoráveis e transmissão por sementes contaminadas (QUEZADO-DUVAL & LOPES, 2010). Os prejuízos causados pela doença são à redução da produtividade causada pela necrose foliar, com consequente redução da superfície fotossintetizante e queda de flores e frutos em formação. No tomate rasteiro, a redução da área foliar expõe os frutos à queima pelo sol (escaldadura), o que afeta diretamente a qualidade dos frutos (LOPES & QUEZADO-DUVAL, 2005).

Tradicionalmente, o controle químico da mancha bacteriana tem sido feito com antibióticos e produtos à base de cobre. No entanto, com o uso contínuo desses produtos pelos agricultores, populações de bactérias resistentes podem surgir, contribuindo para a ineficiência desses produtos (SILVA et al., 2013). O menor número de princípios ativos registrados para controle de doenças bacterianas é responsável pela maioria dos agrotóxicos aplicados indevidamente (BETTIOL, 2009).

Em relação à resistência genética, não existem no mercado variedades comerciais de tomate com resistência a mancha bacteriana (QUEZADO-DUVAL et al., 2014). Este fato, aliado com a pouca disponibilidade de produtos eficazes, tem propiciado a busca por alternativas de controle para a doença (NASCIMENTO et al., 2013). Assim, o controle biológico tem se tornado uma opção para o controle da mancha bacteriana e muitos trabalhos têm obtido resultados positivos no controle da doença, com destaque para a utilização de bactérias que também são promotoras de crescimento (BYRNE et al., 2005; JI et al., 2006;

ROBERTS et al., 2008; LANNA FILHO et al., 2010). Frente a uma demanda cada vez maior de produtos biológicos e de modos mais eficazes no controle da mancha bacteriana do tomateiro. Devido a isso, 8 isolados de bactérias previamente selecionadas foram cedidas pela empresa do ramo agrícola, Grupo Farroupilha em parceria com o Instituto Federal Goiano, para que se fosse definida a capacidade de controle e os meios pelos quais isolados de rizobactérias promovem o controle da doença, sendo este o objetivo da presente proposta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Identificar isolados de rizobactérias capazes de controlar a mancha bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas perforans* por meio de diferentes modos de ação.

2.2 Objetivos Específicos:

- Definir quais propriedades antagonísticas à *X. perforans* os isolados de *Thiobacillus* sp. e *Bacillus* spp. apresentam;
- Definir a capacidade dos isolados selecionados de *Thiobacillus* sp. e *Bacillus* spp. em induzir resistência sistêmica em plantas de tomateiro;
- Determinar a capacidade de *Thiobacillus* sp. e *Bacillus* spp. em não permitir redução do teor de clorofila em tomateiro com mancha bacteriana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura do tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, estando presente na culinária de diversos países. Esta espécie foi introduzida no Brasil por imigrantes europeus no século XIX, tendo como centro de origem a Costa Oeste da América do Sul (FILGUEIRA, 2001). O tomateiro é cultivado de duas formas de acordo com sua finalidade, podendo ser para o consumo *in natura* (de mesa), cultivado estaqueado e o para processamento industrial cultivado rasteiro (CAMARGO et al., 2006).

No ano de 2016, o Brasil teve um total de 55.745 mil hectares plantados da cultura com uma produção de 3.545.760 toneladas, sendo no Sudeste a maior concentração da área plantada de tomate com 26.646 mil hectares seguidos do Centro Oeste com 9.421 mil hectares e Nordeste com 9.504 mil hectares. A região Norte apresentou uma produção de 14.060 toneladas, sendo o estado do Pará e Roraima os maiores produtores (IBGE, 2016).

Roraima, nos últimos anos apresentou um aumento da área cultivada e na produção de tomate, o que permitiu ao Estado reduzir a dependência do produto vindo do mercado externo (HALFELD-VIEIRA et al., 2006). No ano de 2016 o Estado se destacou como o segundo maior produtor de tomate da região Norte (IBGE, 2016).

A tomaticultura tem forte relevância econômica no agronegócio brasileiro, pois movimenta uma cifra anual superior a R\$ 2 bilhões, cerca de 16% do PIB gerados pela produção de hortaliças no Brasil. Os estados de São Paulo e Goiás e Minas Gerais são responsáveis pela metade do valor gerado, segundo a Associação brasileira do comércio de sementes e mudas (ABCSEM, 2012).

3.2 Perdas na Produção de Hortaliças por Doenças Bacterianas

À medida que a agricultura se esforça para apoiar a crescente população mundial, as doenças das plantas reduzem a produção e a qualidade das culturas de alimentos, fibras e biocombustíveis. As perdas podem ser catastróficas ou crônicas, mas em média representam 42% da produção das seis culturas alimentares mais importantes (GUEST, 2015).

Em todo o mundo, acredita-se que as doenças das culturas reduzem a produtividade agrícola em mais de 10%, equivalente a meio bilhão de toneladas de alimentos por ano

(DAVINDER et al., 2012). Há um grande número de doenças bacterianas no cultivo de hortaliças no Brasil, que limitam a produção e qualidade do produto para a comercialização e consumo, tendo o seu controle dificultado pela alta adaptabilidade desses microrganismos (BERIAM, 2007; BARROSO, 2016).

As doenças bacterianas ou bacterioses são responsáveis por grandes perdas ao tomateiro. Seu controle é difícil e requer medidas preventivas, já que poucos são os recursos disponíveis para o controle pós-ocorrência da doença na lavoura.

Os danos causados por estas doenças podem variar de uma discreta mancha nas folhas até a desfolha quase completa da planta, com impactos na fotossíntese e na produção. Quando presentes, as lesões no fruto reduzem a comercialização tanto para o mercado *in natura* ou processamento industrial. A desfolha expõe o fruto, resultando em escaldadura, podendo se desenvolver podridões secundárias.

O manejo das doenças bacterianas do tomateiro deve ser de forma preventiva e começar bem antes do transplante. As condições húmidas no dossel da planta devido à chuva, ao orvalho, à umidade elevada ou à irrigação dão às bactérias um ambiente apropriado para o seu desenvolvimento. Cada patógeno tem um intervalo de temperatura ideal, sendo as interações de temperatura e espécies bacterianas componentes de patogenicidade significativas, fora desta escala ótima de temperatura e umidade, sua multiplicação e nível de infecção consequentemente é menor (QUEZADO-DUVAL et al., 2004; ARAÚJO et al., 2011).

Durante o período chuvoso de verão, é fundamental que o produtor de hortaliças adote, de maneira integrada, uma série de medidas que previnam os impactos negativos na produção, incluindo o manejo cultural, bem como o uso de variedades mais rústicas, com o maior número possível de fatores de resistência genética e melhor tolerância ao excesso de umidade (REIS e BOITEUX, 2012). No trabalho feito por Quezado-Duval et al. (2014), foi observado redução de produtividade de 40% em plantas de tomate. É comum o relato de perdas de até 100% para algumas bacterioses como a mancha bacteriana do tomateiro, relatado por Reis e Boiteux (2012), já que grandes danos, por vezes, não compensam os custos com a colheita dos frutos.

3.3 Mancha Bacteriana

A mancha bacteriana do tomateiro é causada por uma ou mais espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, que são: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*,

(JONES et al., 2004) todas estas de ocorrência no Brasil, sendo a mais predominante no país a espécie *X. perforans* e *X. gardneri*, tendo a temperatura papel importante na determinação de qual espécie prevalecerá em determinada região (ARAÚJO et al., 2016).

A mancha bacteriana foi observada pela primeira vez em tomate na África do Sul em 1914 (RITCHIE, 2000 apud BALBI-PENÃ, 2013). No Brasil a doença foi relatada pela primeira vez em 1959 em municípios do estado de São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 1984) e se tornou uma das mais importantes doenças da cultura do tomateiro no país (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997).

A introdução do patógeno em novas regiões é facilitada pelo fato de que as espécies que causam a doença (VAUTERIN et al., 1995; JONES et al., 2004) podem ser transmitidas por meio de sementes, que configura um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação do patógeno (CARMO et al., 2004; SILVA et al., 2013). Bactérias fitopatogênicas transmissíveis por sementes podem estar associadas às sementes de diferentes formas: aderidas aos tricomas, ao tegumento ou embrião e, ou sob o tegumento e serem eficientemente transmitidas para as plantas em condições de viveiro ou campo (ROMEIRO, 2005; SILVA et al., 2013).

As condições ideais para ocorrência de epidemias da mancha bacteriana são temperaturas entre 22 e 28 °C e umidade relativa entre 95 e 100%, associada com presença de água livre sobre os tecidos (LOPES e SANTOS, 1994). A mancha bacteriana é mais severa em locais onde ocorrem chuvas associadas a ventos fortes, segundo Barreto e Scaloppi (2007), características das chuvas torrenciais em regiões tropicais. O patógeno pode sobreviver em restos de cultura e em outras plantas hospedeiras. Em estudos feitos por Araújo (2010), demonstrou que na menor temperatura (20° C), a *X. gardneri* apresentou maior severidade que *X. perforans*, já para a maior temperatura (30° C), *X. perforans* foi quem se destacou como a espécie de maior agressividade. Este resultado indicou que a temperatura exerce papel importante na determinação de qual espécie será prevalecente numa determinada região.

Os sintomas da mancha bacteriana podem ser facilmente identificados, pelo encharcamento do tecido foliar, que adquire coloração verde-escura nos sítios de infecção, sendo comum o início do desenvolvimento das lesões a partir dos bordos foliares. As lesões avançam rapidamente em direção ao centro progredindo para uma queima severa, podendo apresentar halo amarelado em torno do tecido necrosado. Com o progresso da doença, ocorre seca das folhas e, posteriormente, desfolha, reduzindo consideravelmente a produtividade. Ao atingir os feixes vasculares a bactéria causa infecção sistêmica, podendo ocasionar necrose

severa em ramos e, ocasionalmente, até a morte da própria planta (RITCHIE, 2000 apud BALBI-PENÃ, 2013).

As manchas em frutos de tomate podem atingir cerca de 0,5 cm e iniciam como áreas encharcadas de cor verde pálido, tornando-se, eventualmente, elevadas, marrons (castanhas) e ásperas. Essas manchas podem servir de pontos de entrada para infecção por fungos e outras bactérias, que causam podridões secundárias de frutos. Os agentes causais da mancha bacteriana não causam podridão de frutos (RITCHIE, 2000 apud BALBI-PENÃ, 2013). A bactéria penetra na planta através dos estômatos ou através de ferimentos provocados por equipamentos ou tratos culturais como amarrio e desbrota (ARAÚJO, 2010).

Sua disseminação pode ocorrer por meio de mudas contaminadas, plantas daninhas, água da chuva ou irrigação associada ao vento, pelos instrumentos de poda, colheita, ou pelo próprio homem. O patógeno sobrevive principalmente em restos de cultura, sendo que a sua viabilidade pode ser reduzida com o enterrio do material contaminado (SANTOS FILHO et al., 2004).

3.4 Controle Biológico

O controle biológico é definido como a redução da densidade de inóculo ou atividades determinantes da doença causada por um patógeno, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1974).

O emprego de microrganismos para o controle de fitopatógenos pode ser direto, quando esses são utilizados vivos; ou indireto, através da aplicação de seus metabólitos. Em ambos os casos necessita-se obter produtos que mantenham as características responsáveis pelo biocontrole mediante os microrganismos ou dos seus metabólitos. Dessa forma, esses produtos precisam ser adequadamente formulados para facilitar a comercialização, o transporte, a aplicação e o armazenamento, sem que ocorram grandes alterações em suas características (LANNA FILHO, 2010).

O controle biológico tem se tornado uma opção para o controle de doenças de plantas. Com relação ao controle da mancha bacteriana, alguns trabalhos têm obtido resultados experimentais positivos, com destaque para a utilização de bactérias promotoras de crescimento (BYRNE et al., 2005; JI et al., 2006; ROBERTS et al., 2008; LANNA FILHO., 2010). Entretanto, a disponibilidade de produtos comerciais ainda é pequena. Fora do país, existem produtos biológicos avaliados para este fim, como a formulação a

base de *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 (ROBERTS et al., 2008), tal qual já registrado no Brasil para as culturas da cebola, maçã e morango. Entretanto, não há garantias de que o produto será eficiente para o controle da mancha bacteriana do tomateiro.

A atividade antagonista de um microrganismo a partir da síntese de compostos antimicrobianos tem sido uma estratégia de seleção massal de antagonistas potenciais para o controle de fitopatógenos. Avaliações *in vitro* e *in vivo* têm revelado a eficácia de espécies relacionadas ao gênero *Bacillus* spp. na supressão de diversos fitopatógenos agregada à síntese desses compostos (SANTOS, 2014). Carvalho et al., (2010), demonstraram a eficiente síntese *in vitro* de metabólitos secundários por espécies de *Bacillus subtilis* sob limitação de oxigênio, mas na presença de nutrientes essenciais como carbono e nitrogênio.

As plantas possuem habilidade de prevenir ou retardar o estabelecimento dos microrganismos fitopatogênicos em seus tecidos, num processo altamente dinâmico, coordenado e dependente da existência de mecanismos constitutivos e/ou, pós-formados (ALVES, 2007). As defesas pós-formadas podem ser acionadas por exposição a agentes indutores, que funcionam como eliciadores da resposta de defesa (CHOUDHARY et al., 2007). Dos mecanismos bioquímicos pós-formados, se destacam por apresentarem amplo espectro de ação, a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR), que podem ser eliciadas por microrganismos.

Além da observação da efetiva ação dos antagonistas em relação ao controle de doenças de plantas, torna-se necessário o estudo dos mecanismos de ação, de modo a estabelecer a melhor estratégia de manejo, bem como no desenvolvimento de produtos com atuação em diferentes sítios.

3.5 Seleção de *Bacillus* spp. com capacidade de biocontrole *in vivo* e características de antagonismo *in vitro*

As bactérias endofíticas são capazes de diminuir ou prevenir efeitos prejudiciais de alguns organismos fitopatogênicos, devido a ação de mecanismo de biocontrole. Atualmente, em todo o mundo, há grupos de pesquisa trabalhando com busca, seleção e teste de organismos procariotas de modo a selecionar os mais promissores para promoção de crescimento e/ou, biocontrole de enfermidades. A ação efetiva desses mecanismos somente é possível porque bactérias endofíticas e epifíticas colonizam nichos ecológicos similares aos ocupados por fitopatógenos (BERG et al., 2005; LANNA FILHO, 2011).

As metodologias *in vitro* que avaliam a potencialidade antagonica de possíveis agentes de biocontrole não substituem os métodos clássicos de inoculação na planta (ROMEIRO, 2007). Essas metodologias são largamente empregadas por mimetizar eventos que seriam de difícil análise *in vivo*, demonstrando resultados rápidos e de boa reprodução do que aconteceria na planta, auxiliando no processo de seleção de agentes de biocontrole (ROMEIRO, 2007). Dentre as metodologias empregadas destacam-se a de antibiose por difusão em dupla camada, produção de compostos voláteis e produção de sideróforos (DAVISON, 1988). A antibiose por difusão em dupla camada é a mais utilizada para estudos *in vitro* de controle biológico (KÉKESSY e PIGUET, 1970). O antagonismo acontece pela atividade de substâncias excretadas no meio de cultura e não por uma possível competição entre microrganismos.

O isolamento de bactérias com potencial bioativo promissor associado a experimentos em casa-de-vegetação e em campo que atestem a viabilidade do seu uso possibilitará a obtenção de novos agentes de biocontrole. O uso de *Bacillus* tem promovido o aumento de teores clorofila *a*, *b* e total e o crescimento da parte aérea de mudas de tomateiro das cultivares Santa Clara e Cereja (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2015). Este fato confirma os benefícios que as bactérias do gênero *Bacillus* têm trazido ao longo dos anos para a agricultura. É sabido que a clorofila é o pigmento que da cor verde às plantas sendo essencial para a fotossíntese e vida das plantas. É através da fotossíntese que a planta obtém energia para crescer, desenvolver folhas e encher grãos, sendo ainda proporcional à quantidade de nitrogênio absorvida pela planta (ZOTARELLI et al., 2003). Assim, utilizar instrumentos para medir o teor de clorofila, é uma forma indireta de medir a absorção de nitrogênio e seu estado nutricional.

Um dos mecanismos mais importantes de controle biológico de doenças é por meio da indução de resistência sistêmica (IRS). Neste tipo de controle, a penetração ativa do microrganismo induz a planta a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal (LACAVA e AZEVEDO 2014; ARAÚJO et al., 2014). Estas alterações morfológicas e fisiológicas podem incluir aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanase e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira (PEIXOTO NETO et al., 2003). As interações entre micro-organismos e plantas, permitem a exploração para o aumento na produtividade agrícola e industrial, além de um melhor entendimento da ecologia microbiana e ambiental (OLIVEIRA, 2009).

O alto interesse por espécies relacionadas do gênero *Bacillus* está ligado a sua diversidade, seus modos de ação e capacidade de sobrevivência. Essas bactérias podem exibir quase todos os mecanismos de biocontrole e bioestimulação / fertilização. Além disso, uma estirpe pode muitas vezes agir através de vários mecanismos, isto permite que estas bactérias sejam eficazes em variedade de patógenos, plantas e condições ambientais (CAWOY et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados com 8 isolados pré-selecionados, provenientes da coleção do Grupo Farroupilha: *Bacillus* sp. (GF193), *Bacillus* sp. (GF203), *Bacillus methylotrophicus* (GF264), *Bacillus methylotrophicus* (GF267), *Bacillus* sp. (GF271), *Thiobacillus novellus* (GF434), *Bacillus firmus* (GF435) e *Bacillus* sp. (GF451). Os experimentos foram realizados no laboratório de fitopatologia e respectiva casa de vegetação na Embrapa Meio Ambiente no município de Jaguariúna, SP no ano de 2016.

4.1 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro e teor de clorofila em função da aplicação de *B. methylotrophicus* no filoplano

Para verificação da capacidade dos isolados de *Thiobacillus* e *Bacillus* spp. em controlar a mancha bacteriana, foram preparadas suspensões de células dos isolados GF193, GF203, GF264, GF267, GF271, GF434, GF435 e GF451 ($A_{540}=0,2$) que foram aplicadas na parte aérea da planta de tomateiro cv. Santa Clara com estágio de 5 folhas expandidas. Como testemunha foi utilizada somente água. Após 72 horas foi feita a inoculação com suspensão de *X. perforans* ($A_{540}=0,1$). A severidade foi estimada com escala diagramática MELLO et al., (1997) nos dias 6, 11, 16, 20, 22, 24 após a inoculação (DAI) do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituídos de 9 tratamentos com 7 repetições, sendo cada repetição representada por um vaso com uma planta. Os resultados foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9 realizando-se comparação entre médias pelo teste LSD de Fisher a 5% de significância. Para a determinação dos teores de clorofila nas plantas foram realizadas 4 leituras (7, 13, 15 e 19 DAI) com o aparelho Chlorophyll Meter, Modelo SPAD-502 Plus, Konica Minolta para cada tratamento. As

leituras foram realizadas sempre em horários semelhantes no período da manhã, no folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice da planta. Os resultados foram analisados utilizando-se os dados quantitativos representados por unidades SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017), por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e contraste de médias pelo teste LSD de Fisher a 5% de significância.

4.2 Antibiose por difusão em dupla camada

Para avaliar a capacidade dos antagonistas em produzir metabólitos inibitórios à *X. perforans*, isolados de *Thiobacillus* sp. e *Bacillus* spp. previamente selecionados no Instituto Federal Goiano (IFGO), foram cultivados em tubos de ensaios contendo meio de cultura MB1 e mantidos em BOD a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Os antagonistas foram semeados, em pontos equidistantes, na superfície do meio MB1, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, seguindo-se a incubação por 24 h a 28°C . Decorrido este período, colônias surgidas foram expostas a vapor de clorofórmio por cerca de 4 h 30 minutos, após a volatilização, cada placa recebeu sobre-camada de meio semi-sólido fundente ao qual 15 mL. Nesta camada, foi incorporada 150 μL de meio MB1 cultivados por 48 horas em tubos de ensaio líquido, contendo um isolado de *X. perforans*. Após 48 horas foi avaliada a presença de halos de inibição, quando existentes.

4.3 Produção de sideróforos

Foi utilizada a metodologia descrita por Schwyn e Neilands (1987), adaptada por Felestrino (2013). Os isolados foram cultivados em meio MB1 por 48 horas em BOD. Como controle positivo foi utilizado uma bactéria produtora de sideróforo. Após este período os microrganismos foram semeados em meio CAS sólido e a produção de sideróforo foi detectada pela formação de um halo amarelo/alaranjado.

4.4 Seleção de estirpe tolerante de *X. perforans* resistente à rifampicina

Uma cultura de *X. perforans* foi semeada em meio MB1 em doses crescentes de antibiótico rifampicina nas concentrações (20 40, 80, 120, 160 e 200 ppm), a cada 24 horas de

crescimento, o patógeno foi cultivado em uma nova placa de concentração maior que a anterior até atingir a concentração de 200 ppm de antibiótico.

4.4.1 Dinâmica do antagonismo entre *B. methylotrophicus* e *X. perforans* em meio líquido

O isolado GF267 (*B. methylotrophicus*) e *X. perforans* mutante resistente à rifampicina foram cultivados em tubos de ensaio separadamente contendo meio MB1 líquido. Após 24 horas de crescimento em BOD foi retirada uma alíquota de 100 µl de cada isolado e adicionado em um erlenmeyer contendo 200 mL de meio líquido MB1 em outro erlenmeyer foram adicionados 100 µl somente da cultura de *X. perforans* usada como controle. Os erlenmeyers foram mantidos em agitação contínua a 28° C. Após 1, 3, 5, 7, 24 h do início do experimento, foi retirada uma alíquota de 100 µl do meio contendo somente a *X. perforans* e diluídos em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) nas seguintes diluições (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e adicionados em placas Petri contendo meio de cultura sólido MB1 com rifampicina (200 mg/L). Para o tratamento contendo *B. methylotrophicus* e *X. perforans* foi efetuado o mesmo procedimento, utilizando-se as seguintes diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Cada placa constituía uma repetição, sendo 3 repetições por diluição. Após 48 h foi feita a contagem de colônias por placa, determinando-se o número de ufc.mL⁻¹ de *X. perforans*.

4.5 Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono

A capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono foi avaliada para os antagonistas selecionados e para *X. perforans*, pelo uso do kit Biolog® GN2 microplate para *X. perforans*, e Biolog® GP2 microplate para GF267 seguindo as recomendações do fabricante. As avaliações foram realizadas por meio de leitora de placas ELISA, no comprimento de onda de 590 nm, indicando a utilização de respectivas fontes de carbono pelos isolados testados (HALFELD-VIEIRA et al., 2015). A determinação do número de fontes de carbono utilizadas em comum pelo antagonista e pelo patógeno foi calculada pela equação:

NOI = NFCC/NTFOS, onde: NOI: índice de sobreposição de nicho; NFCC: número de fontes de carbono utilizadas em comum pelo patógeno e antagonista; NTFOS: número total de fontes de carbono utilizadas pelo organismo a ser calculada a sobreposição. Para NOI > 0,9 o microrganismo para o qual o índice foi calculado apresenta competência para sobrepor o

nicho do microrganismo correspondente e $\text{NOI} < 0,9$ representa que o microrganismo para o qual o índice foi calculado não apresenta competência para sobrepor o nicho do microrganismo correspondente.

4.6 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro e teor de clorofila em função da aplicação de *B. methylotrophicus* na rizosfera

Em uma segunda etapa foi realizado um novo experimento em casa de vegetação somente com o isolado que se destacou quando dispensado via foliar. Foi preparada uma suspensão de GF267 (*B. methylotrophicus*) com concentração de 5×10^{-7} e adicionados 8 mL da solução no solo ao redor do caule de plantas em estágio de 4 folhas expandidas visando a colonização da rizosfera do tomate. No terceiro dia após a inoculação com o *B. methylotrophicus* foi pulverizada sobre as folhas das plantas uma suspensão de *X. perforans* na mesma concentração. Os tratamentos foram constituídos por plantas contendo: *X. perforans*, *X. perforans* + *B. methylotrophicus*, *B. methylotrophicus* e a testemunha (água). A severidade da doença foi estimada considerando-se a porcentagem de área total foliar sintomática na planta, efetuada com auxílio da escala diagramática proposta por MELLO et al., (1997), a cada dois dias após a inoculação do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado composto por 3 tratamentos com 7 repetições. Os resultados foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e contraste de médias pelo teste LSD de Fisher a 5% de significância.

Para a determinação dos teores de clorofila foram realizadas 4 leituras (8, 10, 12 e 33 DAI) com o aparelho Chlorophyll Meter, Modelo SPAD-502 Plus, Konica Minolta para cada tratamento, *X. perforans*, *B. methylotrophicus* + *X. perforans*, controle 1 (*B. methylotrophicus*) e controle 2 (água). As leituras foram realizadas sempre em horários semelhantes no período da manhã, no folíolo apical da primeira folha composta expandida abaixo do ápice da planta. Os resultados foram analisados utilizando-se os dados quantitativos representados por unidades SPAD (MARTÍNEZ et al., 2017), por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e contraste de médias pelo teste LSD de Fisher a 5% de significância.

4.7 Capacidade de *B. methylotrophicus* em induzir resistência

Para a avaliação da capacidade de indução de resistência, foi preparada uma suspensão de *B. methylotrophicus* com concentração de 5×10^{-7} e adicionados 8 mL da solução no solo ao redor do caule de plantas em estágio de 4 folhas expandidas visando a colonização da rizosfera do tomate. No terceiro dia após a inoculação com o *B. methylotrophicus* foi pulverizada sobre as folhas das plantas uma suspensão de *X. perforans* na mesma concentração. Os tratamentos foram compostos por 20 repetições, constituído por plantas contendo: *X. perforans*, *B. methylotrophicus* + *X. perforans* +, *B. methylotrophicus* e a testemunha (água). Nos dias 1, 3, 5, 7 e 11 após a inoculação do patógeno, iniciou-se a coleta de amostras para determinação da atividade da peroxidase (PO), polifenoloxidase (PPO) e proteína total.



Figura 1. *B. methylotrophicus* inoculados em raízes de tomates. (A) Aplicação do isolado nas raízes das plantas. (B) Plantas cobertas por sacos plásticos após a aplicação do antagonista. (C) Plantas de tomates após 24 h de inoculação por *B. methylotrophicus*.

4.7 Obtenção dos Extratos

A cada dia de coleta, uma amostra de folha de plantas diferentes, sendo quatro plantas por tratamento por dia de coleta (1, 3, 5, 7 e 11 dias) foram utilizadas para produção do extrato vegetal. Cada amostra foi triturada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, adicionando-se ao macerado uma solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, polivinilpirrolidona 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM, na proporção de 6 mL do tampão de extração para cada grama de amostra. O preparado foi centrifugado a 20.000 gramas por 20 minutos a 4° C e os sobrenadantes, coletados, e mantidos em banho de gelo durante os ensaios enzimáticos (BARACAT-PEREIRA et al., 2001).

4.8 Determinação da atividade de peroxidase, polifenoloxidase e proteína total

A atividade da peroxidase foi determinada pela reação de 90 μL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,5), 90 μL de guaiacol 15,0 mmol L^{-1} , 90 μL de peróxido de hidrogênio 3 mmol L^{-1} e 10 μL de extrato. As leituras de absorbância foram efetuadas de 30 em 30 s por 15,5 minutos a temperatura de 30° C em espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm utilizando programa Magellan incorporado ao equipamento Tecan. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em unidades de absorbância mg^{-1} tecido. min^{-1} (HALFELD-VIEIRA et al., 2006; ZERAIK et al., 2008).

A polifenoloxidase foi determinada utilizando 200 μL de pirocatequina a 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) e 20 μL de extrato enzimático. As leituras foram efetuadas 10 em 10 segundos por 5 minutos a temperatura de 30° C em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm no programa Magellan. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em unidades de absorbância. mg^{-1} .tecido. min^{-1} (DUANGMAL e APENTEN, 1999).

Para a determinação do teor de proteína foi utilizada a metodologia descrita por BRADFORD (1976). O método se baseia na ligação da proteína, presente no extrato vegetal, com o reagente Bradford (Sigma B6916). A amostra foi preparada em um tubo contendo 25 μL de extrato para 1000 μL de solução do Bradford (Sigma B6916), na proporção 2:8. Foi preparada uma solução com 50 μL de solução tampão (pH=6,8) com 2000 μL de solução do Bradford (2:8 μL) como branco. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro à 595nm entre 2 minutos e 1 hora. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por 15 repetições em que cada dia de coleta, 4 folhas de plantas diferentes foram retiradas por tratamento e utilizada para obtenção do extrato, sendo cada uma folha uma repetição por tratamento. Os resultados foram analisados por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste LSD de Fisher a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro em função da aplicação de *Bacillus* spp. e *Thiobacillus* sp. em filoplano

Para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), dos 8 isolados testados por aplicação foliar, somente GF267 (*B. methylotrophicus*) foi eficaz em reduzir a intensidade média da mancha bacteriana, com 60% de controle. Na a avaliação da severidade, os isolados GF264, GF271, GF203, GF435 e GF267 foram capazes de reduzir a mancha bacteriana em folhas de tomateiro (Figura 2). Estes resultados juntamente com os obtidos *in vitro* deram base para uma segunda avaliação em casa de vegetação, utilizando apenas o isolado GF267 que foi dispensado via raiz. Em trabalho feito por Ferraz et al. (2015), a severidade final e AACPD foram significativamente reduzidos com o uso de *B. cereus* contra a mancha bacteriana do tomateiro. Estes resultados obtidos a partir da investigação da intensidade da doença revelam que *B. cereus* pode induzir resistência em plantas de tomate contra mancha bacteriana.

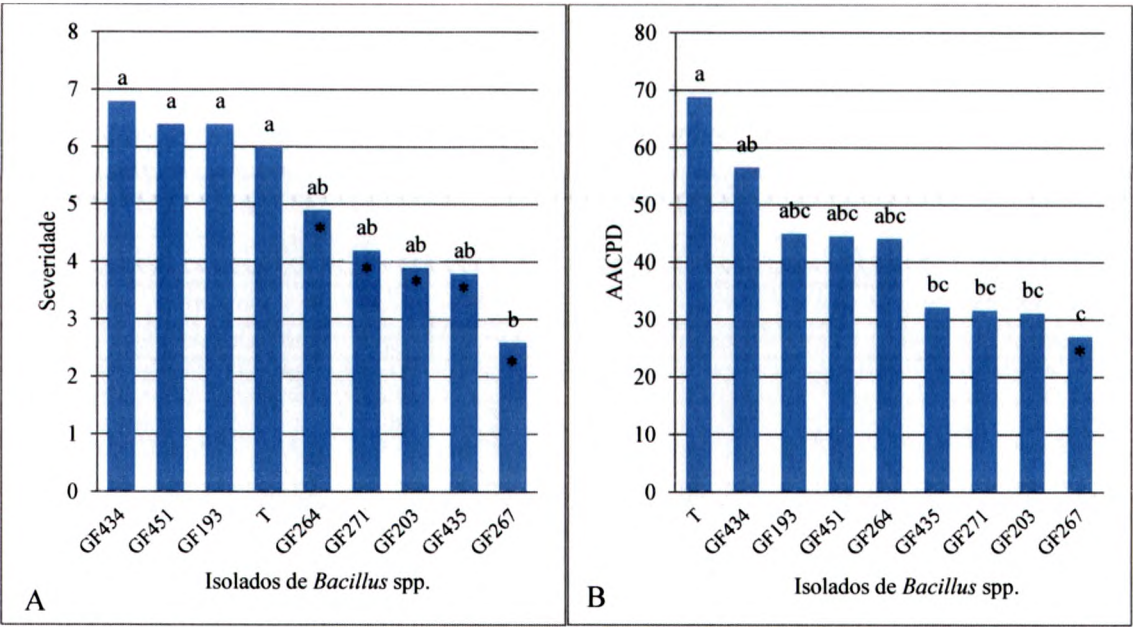


Figura 2. Severidade aos 18 dias após a inoculação com *X. perforans* (A) e AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença) em plantas de tomateiro (B), colonizadas via foliar com um isolado de *Thiobacillus* sp. e 7 isolados de *Bacillus* spp.. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de LSD de Fisher a 5%. (*) Tratamento significativo conforme o teste Dunnett (5%).

5.2 Antibiose por difusão em dupla camada e em meio líquido

Os isolados de *Bacillus* spp. GF264 (0,8 cm), GF267 (0,8 cm), GF203 (0,5 cm), GF451 (0,9 cm) apresentaram halo de inibição conforme a Figura 3. Os isolados GF193, GF435, GF271 e GF434 não apresentaram zona de inibição contra a *X. perforans*. Os halos de inibição ocorrem por meio da produção de substâncias antimicrobianas ou qualquer composto metabolizado pelo microrganismo capaz de matar ou inibir o crescimento ou reprodução de microrganismo fitopatogênico (GRIFFIN, 2014). A sensibilidade aos compostos produzidos pelos biocontroladores pode variar em função do isolado patogênico (ROCHA et al., 2013). No trabalho realizado por Monteiro et al., (2005), a inibição do crescimento da *X. campestris* pv. se deu por quatro isolados de *Bacillus* testados, *B. subtilis*, *B. megatarium* pv. *cerealis*, *B. cereus* e *B. megaterium*. Lanna Filho et al., (2010) comprovaram com seus resultados que os microragnismos *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus macerans* inibiram o crescimento de *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* testada *in vitro*. Os dados obtidos reforçam a premissa de que bactérias pertencentes a este gênero são promissoras em produzir compostos antimicrobianos para diversos fitopatógenos, podendo atuar no biocontrole por meio de antibiose.

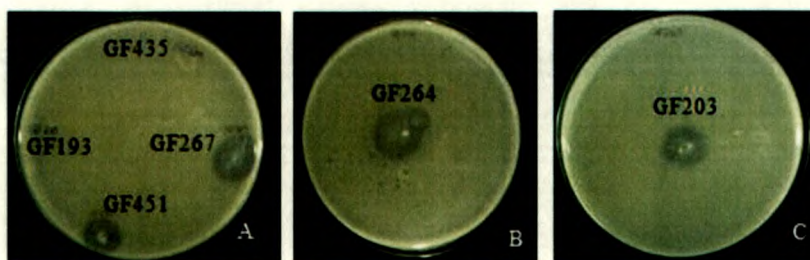


Figura 3. Antibiose dos isolados de *Thiobacillus* sp. e *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas perforans*. GF193 - *Bacillus* sp., GF451- *Bacillus* sp., GF267 - *B. methylotropicus*, GF435 - *B. firmus* (A), GF264 - *B. methylotropicus* (B), GF203 - *Bacillus* sp. (C).

No tratamento controle onde havia somente o patógeno, as colônias se mantiveram em crescimento exponencial até às 24 horas, enquanto no tratamento com o *Bacillus* + *X. perforans* a contagem de colônias só foi possível nas primeiras 3 h (Figura 4).

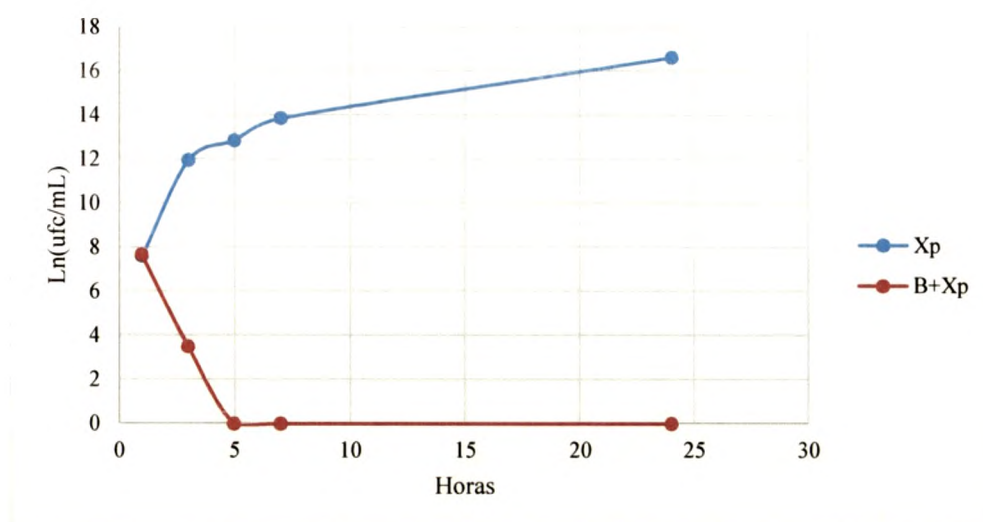


Figura 4. Crescimento de *X. perforans* em meio líquido quando crescida concomitantemente com o isolado de *B. methylotrophicus* ou na ausência deste. Dados de ufc.mL⁻¹ transformados para Ln.

Após 5 h de cultivo concomitante do antagonista e patógeno no mesmo substrato, as células de *X. perforans* adicionadas ao meio perderam totalmente a viabilidade. A antibiose em meio de cultura líquido confirmou o resultado obtido no ensaio de antibiose por dupla camada, demonstrando uma rápida capacidade da produção de substância inibitória ao crescimento de *X. perforans* e de matar as células do fitopatógeno.

No trabalho feito por Lanna Filho et al., (2010), pode se verificar que dois isolados de *Paenibacillus macerans* e *Bacillus pumilus*, residentes de filoplano de tomateiro, foram capazes de reduzir a severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta-preta (*Alternaria solani*) por antibiose.

Abdalla et al. (2014), encontraram vinte e sete isolados de *Bacillus* com capacidade antagônica contra o fitopatógeno *A. alternata*. Devido à produção de compostos antimicrobianos. As espécies de *Bacillus* também apresentaram ação antagônica contra fungos fitopatogênicos (ANGONESE et al., 2009; DALAL e KULKARNI 2013).

A espécie *Bacillus subtilis* é conhecida por produzir diversos lipopeptídios de características biológicas com atividades antimicrobiana, como surfactina, fengicina, iturina, mersacidina e bacilomicina (CHUNG et al. 2008), enquanto os isolados de *Bacillus circulans* produzem circulocina, que apresenta ação antibiótica em bactérias Gram positivas. Essas duas espécies, frequentemente, são relatadas como agentes promotores de crescimento

de plantas (KUMAR et al. 2012), indutores de resistência (PIETERSE et al. 2014) e agentes de biocontrole de fitopatógenos (LI et al. 2012, ZHAO et al. 2013). Carrer Filho et al. (2015), obtiveram resultados com isolados de *Bacillus* sp. que produziram *in vitro* substâncias solúveis com ação inibitória ao crescimento de propágulos de três raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causador da murcha de fusário em tomateiro.

Os isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram inibição patógeno *in vitro* destacaram-se na supressão da doença *in vivo* quando dispensados nas folhas, o que reforça a hipótese da ação de substâncias antimicrobianas contribuindo para o biocontrole.

5.3 Capacidade de Metabolizar Diferentes Fontes de Carbono

Para o metabolismo de diferentes fontes de carbono foi constatado que *X. perforans* foi capaz de utilizar 78% das fontes carbono, enquanto o *B. methylotrophicus* usou 81% das fontes. Entre as fontes, para aminoácidos e álcoois os índices de sobreposição de nicho foram iguais ou maiores que 0,9 considerando tanto a sobreposição do antagonista sobre o patógeno quanto vice-versa, indicando que ambos são capazes de competir de forma equivalente por estes mesmo elementos, sem evidência de vantagem competitiva por *B. methylotrophicus* ou *X. perforans* especificamente (Tabela 1). Desta forma, infere-se que aquele que se estabelecer primeiro no filoplano poderá ter uma vantagem sobre o outro, por meio da exclusão prévia de nicho (HALFELD-VIEIRA et al., 2015). De forma geral observa-se equilíbrio entre ambos em relação à competição por nutrientes e que o isolado testado apresentou potencial de competição com o patógeno por alguns elementos.

O controle biológico pode ocorrer principalmente devido a atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira, por antagonismo, e/ou por competição por nutrientes (LACAVA e AZEVEDO 2014; ARAÚJO et al., 2014). *Bacillus subtilis* é um microrganismo competidor por fontes de nutrientes e espaço segundo Lanna Filho (2010). Carvalho et al. (2008), demonstraram que o isolado de *Bacillus* sp. é versátil em utilizar diversas fontes de carbono, porém com atividade variável de acordo com cada fonte.

Tabela 1. Índices de sobreposição de nicho (NOI) dos isolados *B. methylotrophicus* e *X. perforans*.

Índice de sobreposição de nicho		
Fontes de Carbono	Bac/Xp	Xp/Bac
Totais	0,8	0,8
Carboidratos	0,8	1
Aminoácidos	0,9	0,9
Ác. Orgânicos	0,8	0,8
Álcoois	1	1
Amidas e Aminas	0,5	1

(NOI) < 0,9 não representa sobreposição de nicho de um microrganismo sobre o outro.

(NOI) > 0,9 representa sobreposição de nicho de um microrganismo sobre o outro.

5.4 Produção de sideróforos

Para os 8 antagonistas, apenas *Thiobacillus novellus* (GF434) não apresentou capacidade de produção de sideróforo. Os isolados *Bacillus methylotrophicus* (GF264), *Bacillus firmus* (GF435), *Bacillus methylotrophicus* (GF267), *Bacillus* sp. (GF271), *Bacillus* sp. (GF193), *Bacillus* sp. (GF203) e *Bacillus* sp. (GF451) apresentaram variação na intensidade do halo no meio CAS agar. A bactéria *X. perforans* também foi capaz de produzir sideróforo no meio. O isolado GF267 (*Bacillus methylotrophicus*) apresentou coloração amarelo-alaranjada mais intensa em meio que os demais. O método para detecção da produção de sideróforos, desenvolvido por Schwyn & Neilands (1987) se baseia no princípio de que o complexo cromo azurol + ferro, assume originalmente a coloração azul escura quando adicionado em meio de cultura. Quando retirado deste complexo o íon ferro pelo sideróforo, o corante cromo azurol muda de coloração, tendendo para o amarelo-alaranjado (Figura 5). Bactérias do gênero *Bacillus* são metabolicamente versáteis, o que permite a síntese de uma ampla variedade de compostos bioativos estruturalmente complexos, a exemplo dos policetídeos, lipopeptídeos, sideróforos e peptídeos (HAMDACHE et al., 2011) de grande aplicabilidade biotecnológica.

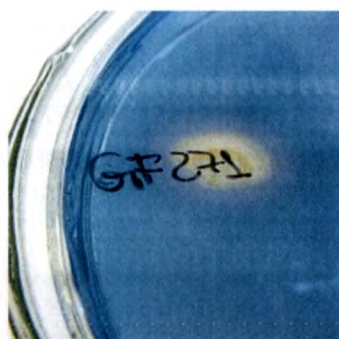


Figura 5. Placas de Petri contendo meio CAS agar, mostrando a produção de sideróforo por *Bacillus* sp.

Alguns trabalhos mostram que a excreção de sideróforos por bactérias da rizosfera pode estimular o crescimento de plantas, melhorando sua nutrição ou pode inibir o estabelecimento de patógenos de plantas, pelo sequestro de ferro do meio ambiente. A competição por ferro, mediada pela produção de sideróforo, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos (WELLER, 1988; BENEDUZI et al., 2012). É ressaltado por Ocampos, (2010) que a competição por íons ferro é mais importante em ambientes onde o elemento encontra-se em baixa disponibilidade ou quando o elemento químico está em sua forma reduzida. Tanto rizobactérias como residentes de filoplano produzem em sua maioria, sideróforos. Esses compostos estão muitas vezes envolvidos no controle de organismos causadores de doenças em plantas (BARRA et al., 2008). Szilagyi-Zecchin et al. (2015) demonstraram através de seus estudos que a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, produtora de compostos indólicos e sideróforos, aumentou os teores clorofila *a*, *b* e total e promoveu o crescimento da parte aérea de mudas de tomateiro das cultivares Santa Clara e Cereja.

O ferro é um mineral essencial à vida e, apesar de abundante na natureza, não está prontamente disponível e assimilável pelos organismos vivos. A concentração disponível no meio para a maioria dos microrganismos não é maior que 10^{-18} M, sendo que a maioria deles necessita concentrações de pelo menos 10^{-3} M (VIANA et al., 2013). A disponibilidade de ferro no substrato é determinante para a maioria dos microrganismos, cuja multiplicação e crescimento podem ser limitados em determinada microbiota; portanto, aquele microrganismo que for capaz de sequestrar o ferro do substrato, tornando esse meio mais pobre na forma disponível desse elemento, terá uma vantagem adicional na competição com outros

microrganismos, traduzindo-se tal atividade em importante mecanismo de antagonismo (ROMEIRO, 2007; VIANA et al., 2013).

5.5 Teor de clorofila e severidade da mancha bacteriana do tomateiro em função da aplicação de *B. methylotrophicus* em rizosfera

A colonização de raízes por isolado GF267 (*B. methylotrophicus*) proporcionou a diminuição da severidade da doença nas folhas, ocorrendo nos 5 primeiros dias após a inoculação com o patógeno (Figura 6). Esta redução corrobora com a observação do aumento da atividade de enzimas indicativas de indução de resistência, conforme demonstrado no experimento em que se quantificou a atividade de PO e PPO. A resposta da planta antes da inoculação do patógeno interfere no processo de infecção nos primeiros 5 dias após a inoculação com *X. perforans*. Após este período, os níveis de severidade atingiram níveis similares ao do tratamento em que as plantas foram somente inoculadas com *X. perforans* (Figura 7), indicando ser necessária uma nova aplicação ou a necessidade do desenvolvimento de formulações que permitam um melhor estabelecimento do antagonista nas raízes da planta.



Figura 6. Severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro aos 7 dias após colonização da rizosfera com *B. methylotrophicus* e 5 dias após a inoculação com *X. perforans* (A) e aos 5 dias após a inoculação com *X. peforans* em plantas não colonizadas com *B. methylotrophicus* (controle) (B).

A resposta da planta inoculada com *B. methylotrophicus* envolve ativação da transcrição de numerosos genes relacionados à defesa, abertura de canais de íons, modificações do status de fosforilação das proteínas e ativação de enzimas pré-formadas para realizar modificações nos metabolismos primário e secundário das plantas (GUIMARÃES, 2013). O controle de doenças causadas por fitopatógenos no solo pela colonização das raízes das plantas por rizobactérias pode ocorrer diretamente, por meio de competição por espaço, nutrientes e nicho ecológico ou pela produção de substâncias antimicrobianas (HAAS e DÉFAGO, 2005). Naue et al. (2014), Moss et al. (2007) e Aysan et al. (2003), em estudos verificaram que isolados de *Bacillus* sp. Também proporcionaram redução da intensidade de doenças bacterianas do tomateiro.

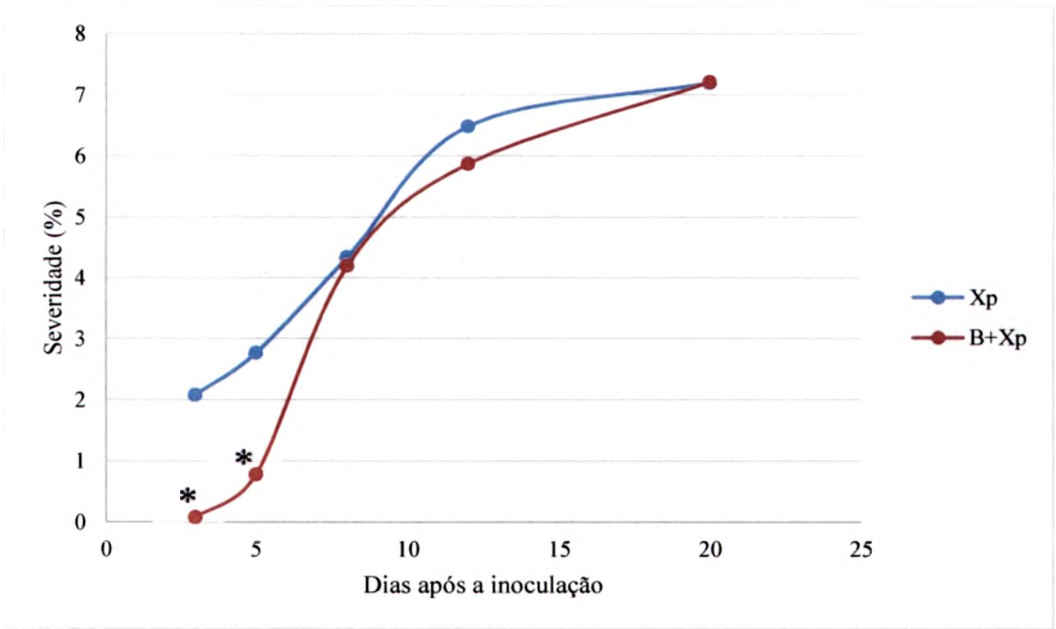


Figura 7. Severidade da mancha bacteriana do tomateiro em plantas com raiz colonizada por *B. methylotrophicus* e inoculadas com *X. perforans* (B+Xp) e somente inoculadas com *X. perforans* (Xp). (*) severidade significativamente menor conforme o teste t a 5%.

O teor de clorofila foi maior nos tratamentos colonizados via raiz com o isolado de *B. methylotrophicus* aos 8 dias após a inoculação (DAI). Aos 10 e 12 (DAI), somente as plantas colonizadas com *B. methylotrophicus* e não inoculadas com *X. peforans* mantiveram teores significativos de clorofila acima dos demais. O tratamento controle 2 (água) manteve os níveis de clorofila aproximadamente estáveis ao longo do tempo (Figura 8). O progresso da

doença fez com que houvesse uma diminuição nos teores de clorofila, devido a necrose e mudança de coloração nos pontos das manchas, aparecendo algumas perfurações nos folíolos, (típico de lesões ocasionadas por *X. perforans*) onde havia os sintomas. Quando o antagonista foi dispensado por meio de pulverização foliar não houve incremento significativo do teor de clorofila (dados não apresentados).

Araújo e Carvalho (2009) observaram que o tomate, cultivar Santa Clara tratados com *Bacillus subtilis* aplicados via raiz, influenciou no crescimento das plantas em variáveis como produção de biomassa da parte aérea, massa total de frutos e número de frutos maduros. Lima (2010) observou que a inoculação de *Bacillus subtilis* em sementes de milho, proporcionou o aumento do teor de clorofila, acúmulo de nitrogênio nos vegetais. Corrêa et al., (2010) demonstrou que o isolado de *B. subtilis* em solução nutritiva teve um efeito positivo no aumento da massa, no número de folhas e no teor de clorofila das plantas de alface em cultivo hidropônico e que na presença do patógeno os índices de clorofila diminuam com o aumento da doença, da mesma forma que observado neste trabalho. Os resultados indicam que *B. methylotrophicus* pode compensar, por certo período, a redução do teor de clorofila em plantas com a incidência da doença e que sua utilização em condições de não ocorrência de doença pode ter um efeito de promoção de crescimento, fato este a ser verificado futuramente em condições de campo.

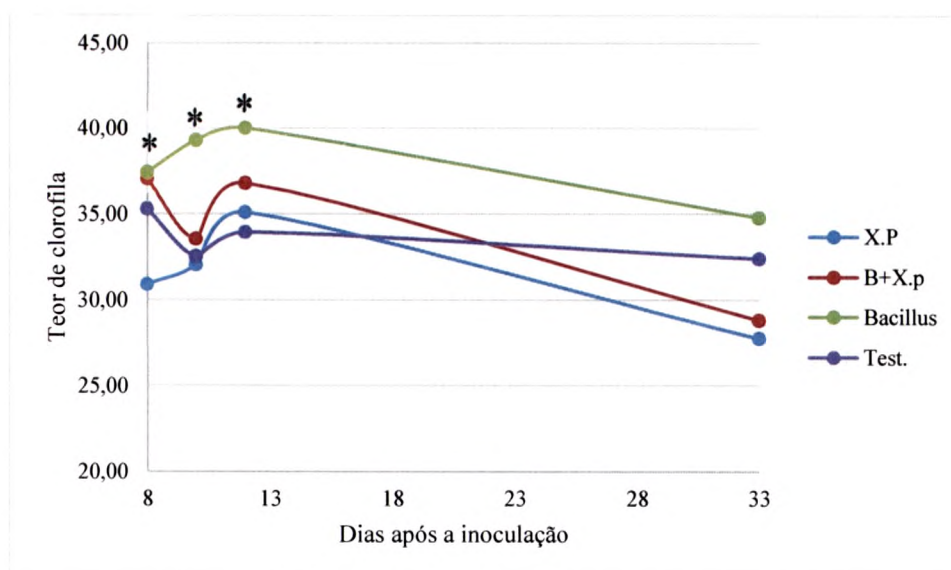


Figura 8. Teor de clorofila (unidades SPAD) em folhas de tomate, inoculadas com *X. perforans* (X.P), *B. methylotrophicus* + *X. perforans* (B+X.p), *B. methylotrophicus* (*Bacillus*) e Testemunha (Test.). (*) Tratamento apresentou diferença significativa dos demais que apresentaram teores menores de clorofila, por meio do teste LSD de Fisher a 5%.

5.6 Indução de Resistência

O antagonista *B. methylotrophicus* em colonização de raízes foi capaz de aumentar a atividade de enzimas como resposta e eliciar mecanismos de defesa em tomateiro. O aumento significativo da atividade das duas enzimas foi verificado aos 3 e 5 dias após a inoculação do patógeno, no tratamento *X. perforans* + *B. methylotrophicus*. O aumento das atividades das enzimas PO e PPO ocorreu antes da visualização dos sintomas da mancha bacteriana, demonstrando deste modo que o sistema de defesa da planta foi eliciado de modo antecipado. As plantas colonizadas com *B. methylotrophicus* via solo apresentaram maior atividade da PO do 3º ao 11º dia quando comparadas com a testemunha ou plantas colonizadas com *B. methylotrophicus*. As plantas somente inoculadas com o patógeno apresentaram aumento significativo da atividade de PO aos 7 dias após a inoculação com *X. perforans*, indicando que isso ocorreu como resposta inerente à planta à presença do patógeno, porém de forma tardia, após o período de incubação (Figura 9).

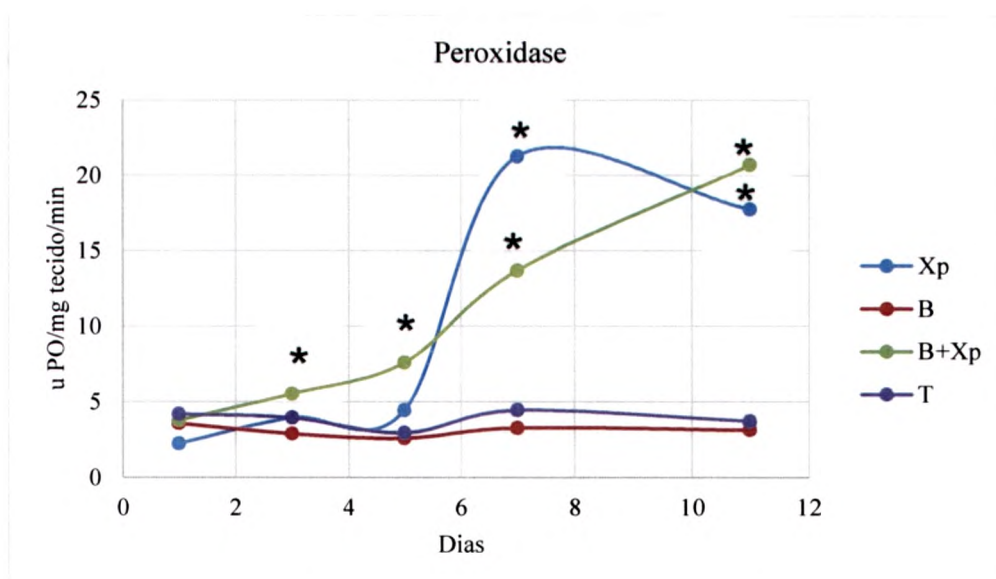


Figura 9. Atividade da peroxidase em folhas de tomateiro que receberam alíquota de água no solo (T), suspensão de *B. methylotrophicus* no solo seguido de inoculação com *X. perforans* na parte aérea 72 h após a colonização (B+Xp), plantas somente inoculadas com *X. perforans* na parte aérea (Xp) e plantas que receberam somente suspensão de *B. methylotrophicus* no solo (B). Tratamentos marcados com * diferiram significativamente dos demais que apresentaram atividade inferior, segundo o teste LSD de Fisher a 5%.

A atividade da PO tem sido associada a diversos processos relacionados à defesa em plantas, como hipersensibilidade, lignificação e suberização (SILVA, 2007) e mudanças na atividade desta enzima têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (VIECELLI et al., 2010). Investigações recentes sobre os mecanismos de controle biológico das PRPs (proteínas relacionadas à patogênese) revelaram que várias estirpes de *Bacillus* spp. interferem no processo de infecção de agentes patogênicos através de um aumento na atividade de PO (FERRAZ et al., 2014, GANESHAMOORTHY et al., 2008; VANITHA e UMESHA, 2011). Segundo Araújo e Menezes (2009), plantas de tomate com raízes colonizadas com *Bacillus subtilis* apresentam atividades maiores de PO em seus tecidos quando comparadas com o controle (água) ou plantas pulverizadas com *B. subtilis* na parte aérea.

A proteção contra os patógenos foliares em tomate, devido à colonização prévia de raízes com *B. methylotrophicus* também foi evidenciada com o aumento da atividade da enzima PPO. As plantas colonizadas com *B. methylotrophicus*, no solo, apresentaram maior atividade da PPO dos 3 aos 5 (DAI) quando comparadas com os demais tratamentos. As plantas inoculadas com *X. perforans* apresentaram aumento significativo da atividade de polifenoloxidase dos 7 aos 11 dias após a inoculação do patógeno, indicando que isso ocorreu como resposta ao processo de infecção por *X. perforans* (Figura 10). Esta enzima desempenha um importante papel na defesa contra agentes patogênicos, oxidando compostos fenólicos em quinonas, que possuem propriedades antimicrobianas (MOHAMMADI e KAZEMI, 2002).

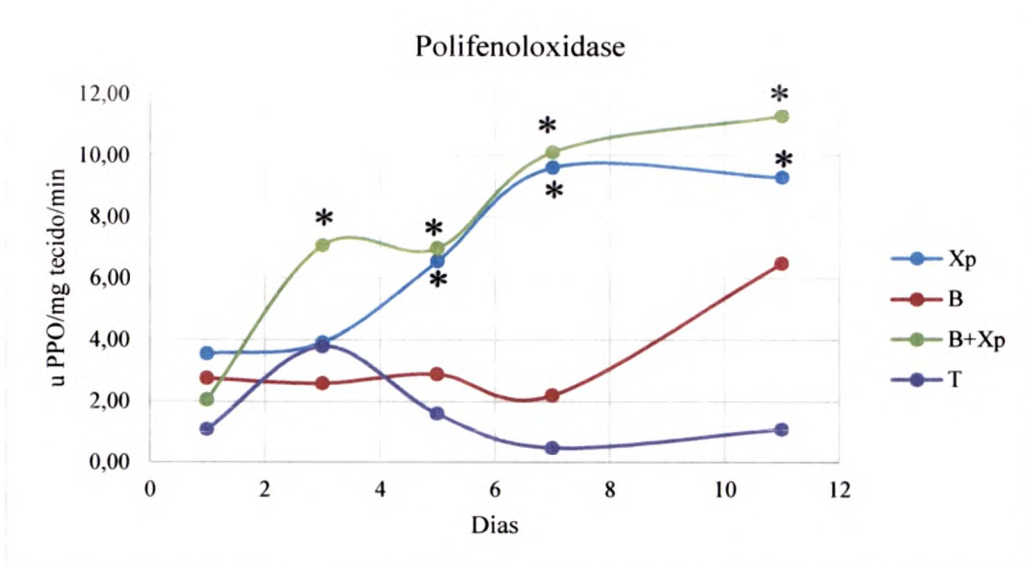


Figura 10. Atividade da polifenoloxidase em folhas de tomateiro que receberam alíquota de água no solo (T), suspensão de *B. methylotrophicus* no solo seguido de inoculação com *X. perforans* na parte aérea 72 h após a colonização (B+Xp), plantas somente inoculadas com *X. perforans* na parte aérea (Xp) e plantas que receberam somente suspensão de *B. methylotrophicus* no solo (B). Tratamentos marcados com * diferiram significativamente dos demais que apresentaram atividade inferior, segundo o teste LSD de Fisher a 5%.

Outros exemplos de eliciação de resposta sistêmica a doenças em tomateiro por bactérias do gênero *Bacillus* também são relatados na literatura. Lanna-Filho (2013) comprovou com estudos que dois gêneros de *Bacillus* foram capazes de atuar como elicitores de resistência induzida em plantas de tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* promovendo o aumento das atividades da enzima peroxidase e polifenoloxidase. Os isolados em contato com a superfície da planta podem sintetizar e liberar continuamente proteínas com atividade desencadeadora da resposta de defesa e, ao mesmo tempo, exercer o biocontrole por mecanismos como a competição por espaço e nutrientes (LANNA-FILHO, 2013). No trabalho feito por Almoneafy et al. (2013), a maior expressão de enzimas PO e PPO foi encontrada nas plantas expostas a *B. subtilis* e *B. methylotrophicus*. A indução de resistência via colonização foliar também é uma possibilidade, como já relatado para *Bacillus cereus* isolado de filoplano de tomateiro contra fitopatógeno bacteriano da cultura (HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

O aumento do teor total de proteínas foi proporcionado nos tratamentos *X. perforans* + *B. methylotrophicus* e *B. methylotrophicus*, apresentando aumento significativo em relação aos demais tratamentos até os 5 dias, demonstrando que a planta teve uma resposta antecipada na síntese de proteínas proporcionada pelo isolado de *Bacillus*. O tratamento somente inoculado com *X. perforans* apresentou aumento evidente na síntese de proteína total somente aos 11 dias (Figura 11). Cabe ressaltar que enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, elas aumentam a velocidade de uma reação química nas plantas. Entre as proteínas, há as relacionadas à patogênese (proteínas-RP), as quais são induzidas nos tecidos vegetais em função da inoculação com patógenos/microrganismos, sistemicamente ou em parte destes, bem como pelo tratamento com agentes químicos (GUZZO, 2003). Deste modo, outras enzimas relacionadas à indução de resistência além das estudadas podem também estar sendo expressas, contribuindo aditivamente para redução da intensidade da doença. Após 5 dias os resultados foram semelhantes entre os tratamentos em que as plantas foram inoculadas com *X. perforans* e também somente colonizadas com *B. methylotrophicus*.

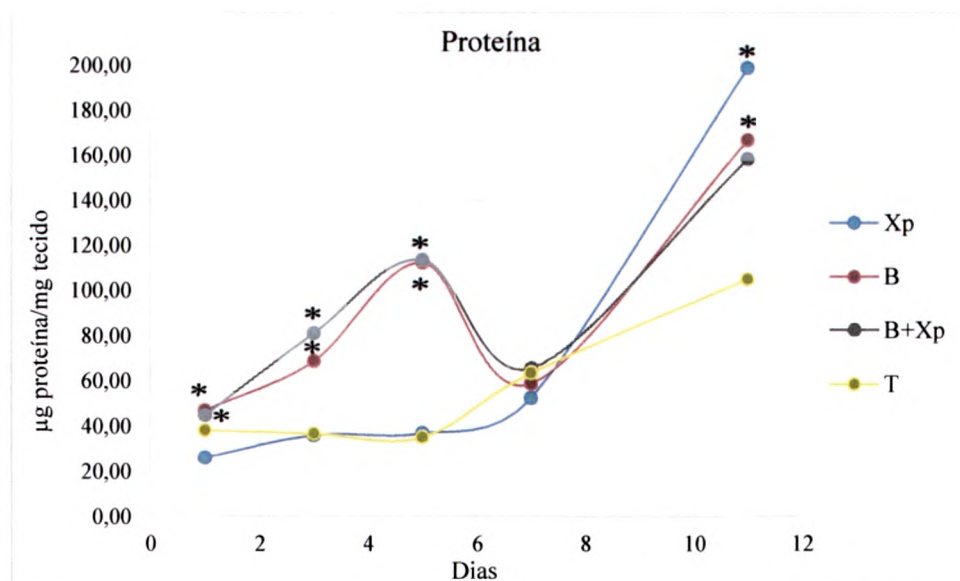


Figura 11. Concentração de proteínas em folhas de tomateiro que receberam alíquota de água no solo (T), suspensão de *B. methylotrophicus* no solo seguido de inoculação com *X. perforans* na parte aérea 72 h após a colonização (B+Xp), plantas somente inoculadas com *X. perforans* na parte aérea (Xp) e plantas que receberam somente suspensão de *B. methylotrophicus* no solo (B). Tratamentos marcados com * diferiram significativamente dos demais que apresentaram atividade inferior, segundo o teste LSD de Fisher a 5%.

O controle biológico e a indução de resistência são alternativas promissoras para uso em um programa de manejo integrado de doenças bacterianas na cultura do tomate. A bactéria *B. methylotrophicus* se demonstrou promissora no controle da mancha bacteriana do tomateiro tanto quando dispensada via foliar quanto via raiz. No entanto, houve um declínio mais acentuado das atividades das enzimas relacionadas à indução de resistência após certo período, como foi revelado pelos resultados, refletindo na perda da capacidade de controle da doença pelo antagonista *B. methylotrophicus* aos 8 dias após a inoculação, quando este foi dispensado para colonização das raízes. Essa redução pode ser explicada através dos resultados obtidos por Ferraz et al. (2015), onde foi preciso uma segunda aplicação do isolado *Serratia marcescens* pela queda significativa da população na rizosfera das plantas de tomate. Há necessidade de adequar principalmente à época de início, bem como a frequência das pulverizações segundo Bernardo e Bettiol (2010), pois os produtos que existem no mercado são de contato e de baixa persistência no ambiente, sendo recomendável aplicação com maior frequência ao longo do tempo (BAYER CROPSCIENCE PORTUGAL, 2009).

6 CONCLUSÕES

O tratamento com GF267 (*B. methylotrophicus*) demonstrou evidência significativa de capacidade de controle da mancha bacteriana do tomateiro, causada por *X. perforans*, tanto quando dispensado para colonização das folhas quanto das raízes.

As evidências demonstram que os mecanismos de ação responsáveis pela capacidade de controle da doença por GF267 (*B. methylotrophicus*) são a antibiose e competição, quando o agente de biocontrole é dispensado nas folhas e de indução de resistência sistêmica, quando é dispensado nas raízes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, S. S et al.. In Vitro Screening of *Bacillus* Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, p.47-50, 2014.

ANGONESE, M et al. Fungistatic effect of *Bacillus* spp on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.

ALMONEAFY, A. A. et al. Synergistic effect of acetyl salicylic acid and DL-Beta-aminobutyric acid on biocontrol efficacy of *Bacillus* strains against tomato bacterial wilt. **Tropical plant pathology**, Brasília , v. 38, n. 2, p. 102-113, abr. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS (ABCSEM). 6º Seminário nacional: tomate de mesa. 2012. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br>> Acesso em 15 de Julho de 2015.

ALVES, E. Mecanismos estruturais na resistência de plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.154-156, 2007.

ARAÚJO, E.R.; COSTA, J.R. ; FERREIRA, M.A.S.V. ; QUEZADO-DUVAL, A.M. . Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathology* (Print), v. 66, p. 159-168, 2016.

ARAÚJO, E. R. et al. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *Xanthomonas gardneri*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 914, p. 39-42, Nov. 2011.

ARAÚJO, E.R. **Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro**. Dissertação de (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 82 p. 2010.

ARAÚJO, F. F.; CARVALHO, M. H. M. Growth of tomato after treatment of plants with bacillus subtilis and carbofuran. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 59-64, 2009.

ARAUJO, F. F de; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.35, n. 3, p. 169-172, 2009

ARAÚJO, W. L et al. Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização. 1. ed. Santarém: UFOPA, v. 1, p. 257, 2014.

AYSAN Y.; KARATA A.; CINAR. O. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. **Crop Protection**, v. 22, p. 807–811, 2003.

BAKER, R., COOK, J. **Biological control of plantpathogens**, San Francisco. W. H. Freeman, 1974.

BARACAT-PEREIRA, M. C. et al. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. **Plant physiology and biochemistry**, v.39, n. 2, p. 91-98, 2001.

BARRA, R. V. et al. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, p. 121-126, 2008.

BAYER CROPSCIENCE PORTUGAL. SERENADE® MAX 2009. Disponível em: <
http://www.bayercropsscience.pt/internet/produtos/produto.asp?id_produto=242> Acesso em:
 05 de Janeiro de 2017.

BENEDUZI, A; AMBROSINI, A; PASSAGLIA, LMP. Plant growth rhizobacteria (PGPR):
 Their potential as antagonists and biocontrol agentes. **Genetics and molecular Biology**, v.
 35, p. 1044-1051, 2012.

BARRETO, M.; SCALOPPI, E.A.G. Sistema de previsão de doenças de hortaliças. In:
 ZAMBOLIM, L. Ed. Manejo integrado – doenças pragas e plantas daninhas. Viçosa UFV,
 p.169-189, 2007.

BERIAM, L. O. S. **Doenças bacterianas em hortaliças**. Palestra. Biológico, São Paulo. v.
 69, n.2, p. 81 – 84, 2007..

BARROSO, K. A. **Levantamento de doenças foliares em hortas urbanas de Petrolina-PE**
 - Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Universidade
 Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias. Petrolina, 40 p. 2016.

BERNARDO, E. R. A; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo
 orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical Plant Pathology**, v..
 35, 1, p. 037-042, 2010.

BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas / Editado por Wagner
 Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. - Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 341 p.
 2009.

BERG, G; EBERL,L;HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic
 human pathogenic bacteria. **Environmet microbiology**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 1673-1685,
 nov. 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein $\frac{3}{4}$ dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BYRNE, J.M. et al. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biological Control**, v. 32 p. 408-418, 2005.

CAMARGO, F.P. et al. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil, resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. *Informações Econômicas*, v. 36, p. 7-20, 2006.

CARMO M. G. F. et al. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 579-584, 2004.

CARRER FILHO, R.; DIANESE, É. de C; CUNHA, M. G. da. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 356-363, set. 2015. Disponível em <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acessos em 10 jan. 2017.

CARVALHO, R. V. de. et al . Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas , v. 28, n. 2, p. 380-386, June 2008 .

CARVALHO et al., A M. growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 643-652, 2010.

CAWOY, H et al. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. 532 p. October 2011. Disponível: < <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modernworld-pesticides-use-and-management> > Acesso em: 12 Outubro de 2016.

CHOUDHARY, D.K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.289-297, 2007.

CHUNG, S. et al. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbial Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 1, p. 115-123, 2008.

COSTA JR. et al.. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 149-154, 2012.

CORRÊA, É. B; BETTIOL, W; SUTTON, J. C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa phytopathologica**, Botucatu , v. 36, n. 4, p. 275-281, dez. 2010 .

DALAL, J.; KULKARNI, N. Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials of Indigenous Endophytic Bacteria of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 62-69, 2013.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria, **Nature Biotechnology**, London, v. 6, p. 282-286, 1988.

DAVINDER S. et al. Taro Leaf Blight—A Threat to Food Security. **Agriculture**, v. 2, p. 182-203, 2012.

DUANGMAL, K., APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, n.3, p.351-359, 1999.

FELESTRINO, É. B. Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microorganismo associado à interação *Langsdorffia hypogaea*-hospedeira-rizosfera. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. 73 p, 2013.

FERRAZ, H. G. M. et al. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. **Bragantia**, v.74, n.4, p.417-427. Sep, 2015.

FERRAZ, H. G. M. et al. Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia**, v.73, p. 274-283, 2014.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças. Viçosa:UFV. Ed. 2, p. 412, 2001.

GANESHAMOORTHY, P. et al. Plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) bioconsortia mediates induction of defense-related proteins against infection of root rot pathogen in mulberry plants. **Journal of Plant Interactions**, v. 3,p. 233-244, 2008.

GRIFFIN, M. F. Biocontrol and Bioremediation: Two Areas of Endophytic Research Which Hold Great Promise. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

GUIMARÃES, L. R. P. **Avaliação da indução de resistência no controle do vira cabeça do tomateiro**. Dissertação de (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências agrônômicas, Botucatu, SP, 83 p., 2013.

GUEST, D. The Impact of Plant Disease on Food Security. Agriculture Editorial Office, 2015.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. In: LUZ, W. C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologias de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.

HAAS D.; DÉFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonads fluorescent*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307-319, 2005.

HALFELD-VIEIRA, B. A. et al. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, v. 80, p. 40-49, 2015.

HALFELD VIEIRA, B. de A.; NECHET, K. de L.; MATTIONI, J. A. M. **Doenças do tomateiro no Estado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, Documentos, 3, p.6, 2006. Disponível em: <<http://www.cpafr.embrap.br>>. Acesso em: 27 Maio 2015.

HALFELD-VIEIRA, B.A. et al. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 1247-1252, 2006.

HAMDACHE, A. et al. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 893-899, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201611_2.shtm> Acesso em: 02 de Janeiro de 2016.

JI, M.P. et al. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under Weld conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 36, p. 358–367, 2006.

KÉKESSY D. A.; PIGUET. J. D. New method for detecting bacteriocin production. **Applied Microbiology**, Washington-DC, v. 20, 282-283, 1970.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, Bethesda, v. 167, n. 8, p. 493-499, 2012.

LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R. da S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 12, p. 1381-1387, Dec. 2010.

LANNA FILHO, R. **Controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* GFP-marcada) bacteriana do tomateiro por isolados endofíticos de *Bacillus* sp.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras. 106 p, 2011.

LANNA-FILHO, R. et al . Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 295-302, ago. 2013.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

LEBOEUF, J. et al . Bacterial diseases of tomato: bacterial spot, bacterial speck, bacterial canker. Edition of OMAFRA Publication 363, Vegetable Production Recommendations, and the OMAFRA, may. 2011.

LI, S. et al. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium wilt* of cotton by root colonization and biofilm formation. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 295-303, 2013.

LIMA, F. F. *Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 54 p. 2010.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, M.A. **Doenças Bacterianas de Hortaliças**. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 10-15, 1997.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 51-58, 1994

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do Tomateiro**. Embrapa Hortaliças. Brasília, 151 p. 2005

JONES J.B. et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 755-762, 2004.

MARTÍNEZ, F. et al. Influence of growth medium on yield, quality indexes and SPAD values in strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v.217, p.17-27, 2017.

MELLO S.C et al. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p.447-448, 1997.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, p.491-498, 2002.

MONTEIRO, L; MARIANO, R. de L. R; SOUTO-MAIOR, A. M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 23-29, Jan. 2005 .

MOSS WP. et al. Biological control of bacterial spot of tomato using hrp mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Biological Control**, v. 41, p.199–206, 2007.

NASCIMENTO, A. dos R et al . Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista v. 31, n. 1, p. 15-24, Mar. 2013.

NAUE, C..R.;ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Biological control of tomato bacterial spot by seed microbiolization. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 413-416, out. 2014 .

OLIVEIRA. F. A et al. Desenvolvimento inicial da mamoneira sob diferentes fontes e doses de matéria orgânica, **Caatinga**, v.22, n.1, p.206-211, 2009.

PEIXOTO NETO, P. A de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 70-84, 2003.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, n. 16, p. 347-375, 2014.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE JÚNIOR, R. P.; TRUFFI, D.; CAMARGO, L. E. A. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in Central-West Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, EUA, v. 88, n.2, p. 157-161, 2004.

QUEZADO-DUVAL, A.M. et al. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. M.T. Momol, P. Ji & J.B. Jones (Eds). **Acta Horticultura**, v. 695, p.101-108, 2005.

QUEZADO-DUVAL AM; LOPES CA. **Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular técnica 84). 28p. 2010

QUEZADO-DUVAL, A. M et al . Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista,v.32, n.4, p.446-452, 2014. Disponível em <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acesso em 20 Dez. 2016.

REIS, A; BOITEUX, L. S. **Plantio de hortaliças no período de chuvas requer manejo adequado**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Circular técnico) 2012.

RITCHIE, D.F. **Bacterial spot of pepper and tomato/ Mancha bacteriana de pimentão e tomate** 2000. Tradução BALBI-PENÑA, M.I. 2013. Disponível em:<<http://www.apsnet.org>>. Acesso em: 12 de Maio de 2015.

ROBERTS, P.D. et al. Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar-*S*-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato. **Crop Protection**, v. 27, p. 1519-1526, 2008.

ROCHA, D. J.; A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical plant pathology**, Brasília, v.38, n.5, p.23-430, out. 2013 .

RODRIGUES NETO J.; SUGIMORI M.H.; MALAVOLTA JUNIOR V.A. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye, no estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico, v. 51, p.13-16, 1984.

ROMEIRO, R. S. Controle biológico de enfermidades de plantas: procedimentos. Viçosa: UFV, 172 p., 2007.

ROMEIRO R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV. 417 p, 2005.

SANTOS FILHO, H.P. et al. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A; CUNHA, M. A. P. (Ed). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 239-280, 2004.

SANTOS, D. R. dos. **Isolamento e seleção de bactérias antagonistas a fitopatógenos e detecção de genes associados á produção de compostos bioativos**. Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade)- Universidade Federal de Sergipe, 58 p, 2014.

SCHWYN, B; NEILANDS, J.B. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, v. 160, p.47-56, 1987.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murchas (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 109 p, 2007.

SILVA, D. AG da et al . Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista , v. 31, n. 1, p. 50-58, Mar. 2013 .

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa , v. 38, n. 1, p. 26-33, mar. 2015 .Disponível em <<http://www.scielo.mec.pt/scielo>>. Acesso em 04 jan. 2017.

VANITHA, S. C., UMESHA, S. Mediated systemic resistance in tomato is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. *Pseudomonas fluorescens* **Biologia Plantarum**, v. 55, p. 317-322, 201.

VAUTERIN L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 472-489, 1995.

VIANA, F. M. P. Produção de Sideróforos por Leveduras Antagônicas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, CE, edição 1, 2013. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br//Melo_RizobacteriasPromotoras> Acesso em: 4 de Janeiro de 2017.

VIECELLI, C. A. et al . Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 73-80, Mar. 2010 .

WELLER, D. M. Biological controlo f saiborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1998.

ZERAIK, A. N. et al. Desenvolvimento de um Spot Test para o Monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, vol. 31, n. 4, 731-734, 2008.

ZHAO, Q. et al. Biocontrol of Fusarium wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. , **Amsterdam**, v. 58, n. 2, p. 283-292, 2013.

ZOTARELLI, L. et al. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, Set, 2003.