



**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO - ATU**

**Potencial biotecnológico de bactérias para o controle de  
diferentes patógenos da cultura do tomate, *Solanum lycopersicum* L**

**Biotechnological potential of bacteria to control different pathogens of tomato crop,  
*Solanum lycopersicum* L**

**GERSIMAR PEREIRA MONTEIRO**

Manaus-AM  
2022

**GERSIMAR PEREIRA MONTEIRO**

**Potencial biotecnológico de bactérias para o controle de  
diferentes patógenos da cultura do tomate, *Solanum lycopersicum* L**

Projeto de dissertação de mestrado  
apresentado ao Programa de Pós-graduação  
Agricultura no Trópico Úmido do Instituto  
Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva  
Coorientadora: Fernanda Fátima Caniato

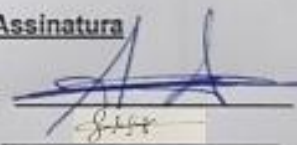

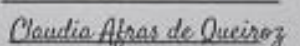
Manaus-AM  
2022

## DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa Presencial de Dissertação de Mestrado de Gersimar Pereira Monteiro, aluno do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, realizada no dia 29 de junho de 2022.

Aos 29 dias do mês de junho de 2022, às 14h, realizou-se por videoconferência a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado, intitulada: "Potencial biotecnológico de bactérias para o controle de diferentes patógenos da cultura do tomate, *Solanum lycopersicum* L." do aluno Gersimar Pereira Monteiro, sob a orientação do Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva (EMBRAPA) em conformidade com o Artigo 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA) e Artigo 60 do Regimento Interno do PPG-ATU como parte de suas atividades para conclusão e obtenção do título de "MESTRE EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO". A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Dr. André Luis Willerding (INPA), Dra. Simone de Melo Santana Gomes (UFAM) e Dra. Cláudia Afras de Queiroz (EMBRAPA). O Presidente da Banca Examinadora deu início à sessão, convidando os membros e o (a) Mestrando (a) a tomarem seus lugares. Em seguida, O Sr. Presidente informou sobre o procedimento do exame. A palavra foi facultada ao (a) Mestrando (a) para apresentar uma síntese do seu estudo e responder às perguntas formuladas pelos membros da Banca Examinadora. Após a apresentação e arguição pelos membros da Banca Examinadora esta decidiu por **APROVADO**. O Certificado de conclusão do Curso de mestrado e o Diploma o aluno receberá somente o título após cumprir as exigências do Art. 54 do Regulamento Geral dos programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* datado de 29 de fevereiro de 2008. Serão conferidos ao (a) aluno (a) após a apresentação, um prazo máximo de 30 (trinta) dias após a Defesa da versão definitiva contendo as modificações sugeridas pela Banca e impressa em 02 (duas) cópias e 1 (uma) cópia em meio digital (arquivo preferencialmente em .pdf, que inclua todo o texto, figuras e outras matérias que fazem parte da dissertação). Nada mais havendo, a sessão foi encerrada, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

### BANCA EXAMINADORA:

<u>Nome</u>	<u>Parecer</u>	<u>Assinatura</u>
André Luis Willerding	( x ) Aprovado ( ) Reprovado	
Simone de Melo Santana Gomes	( x ) Aprovado ( ) Reprovado	
Cláudia Afras de Queiroz	( x ) Aprovado ( ) Reprovado	

( ) com "Distinção" ( ) com "Distinção e Louvor"

Manaus (AM), 29 de junho de 2022.

Obs.: O mestrando deverá entregar na versão final a dissertação contendo o ABSTRACT. E deverá também reforçar a discussão dos seus resultados comparando seus dados com outras publicações ou referência quanto à efetividade do controle biológico porposto.

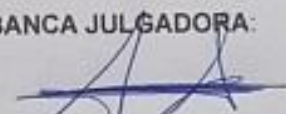
### Folha de Aprovação

Banca Julgadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado.

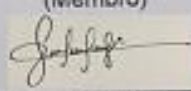
**TÍTULO:** "Potencial biotecnológico de bactérias para o controle  
de diferentes patógenos da cultura do tomate, *Solanum  
lycopersicum* L".

**AUTOR (A):**  
Gersimar Pereira Monteiro

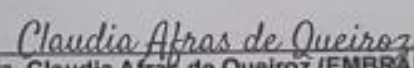
**BANCA JULGADORA:**



\_\_\_\_\_  
Dr. André Luís Willerding (INPA)  
(Membro)



\_\_\_\_\_  
Dra. Simone de Melo Santana Gomes (UFAM)  
(Membro)



\_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Afras de Queiroz (EMBRAPA)  
(Membro)

Manaus, 29 de junho de 2022

## Ficha Catalográfica

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

---

M775p Monteiro, Gersimar Pereira

Potencial biotecnológico de bactérias para o controle de diferentes patógenos da cultura do tomate, *Solanum lycopersicum* L / Gersimar Pereira Monteiro; orientador Gilvan Ferreira da Silva; coorientadora Fernanda Fátima Caniato. - Manaus:[s. 1.], 2023.

6.5 MB

55 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido – PPG-ATU) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. *Solanum lycopersicum* L. 2. Biocontrole. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Caniato, Fernanda Fátima. III. Título.

CDD 583.952

---

A Jesus Cristo por ter morrido a minha morte e compartilhado comigo a sua vida.

A minha amada esposa Áurea Lopes Monteiro que sempre esteve ao meu lado e sempre compreensiva na minha ausência.

A minha filha Gabriela Lopes Monteiro pelo seu incentivo e apoio nas minhas pesquisas.

Ao meu filho Davi Lopes Monteiro por ter sido meu parceiro e incentivador nas pesquisas laboratoriais.

Com carinho,

Ao Engenheiro Agrônomo Doutor Ariel Dotto Blind e ao Engenheiro Florestal Msc. Luiz Alberto Guimarães de Assis (Tirico), pessoas humildes de coração, caráter ilibado, que com compromisso e amor à construção do conhecimento sempre estão dispostas a ajudar e orientar nas difíceis trilhas do saber científico, pelo privilégio de tê-los conhecido e convivido aprendendo prazerosamente.

**Dedico**

## **Agradecimentos**

A Deus, excelso criador de todos os universos, humildemente eu agradeço pela minha vida, por me sustentar com sua infinita bondade e amor. E por me abençoar com inteligência necessária para eu contribuir com o conhecimento científico.

A minha esposa, Aurea Lopes Monteiro, meus filhos, Gabriela e Davi Lopes Monteiro, por valorizarem minha busca pelo saber e pelo amor incondicional que me ofertam a cada dia e por estarem sempre presentes motivando para que eu concluísse mais essa importante etapa da vida. Aos meus orientadores Gilvan Ferreira da Silva e Fernanda Fátima Caniato pela paciência em me ensinar, pela confiança, apoio e pelos ensinamentos que servirão de base para toda a minha vida profissional.

Ao Fitopatologista Doutor Rogério Eiji Hanada e a todos os docentes que com amor ao sacerdócio de ensinar enriquecem e valorizam o curso de Pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido.

Ao Engenheiro Agrônomo Msc. José Nilton Rodrigues Figueiredo e aos demais técnicos e funcionários do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia que sempre voluntariamente estiveram dispostos para colaborar na realização desta pesquisa.

A minha nobre colega de trabalho Lilian Silva Monteiro que com imaculada amizade sempre me incentivou a conquistar essa vitória.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, por me oferecer a oportunidade de integrar equipe de pesquisa científica e pela relevante formação oferecida através do curso de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido.

Ao CNPq pela importante concessão da bolsa de estudos e pela participação em eventos científicos financiados por esta nobre instituição.

Meus humildes e sinceros agradecimentos!

“O coração do entendido adquire o conhecimento, e o ouvido dos sábios busca a sabedoria (Provérbios 18. 15)”

## Resumo

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família das solanáceas e é originário da região andina, compreendendo Peru, Bolívia e Equador. Dentre as frutas caracterizadas como hortaliças, o tomate é a mais consumido no mundo, além de ser fonte de antioxidantes, como o licopeno. No entanto, a produção do tomate pode ser comprometida por diversas doenças de origem bacteriana e fúngica. A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, a murcha de esclerócio causada por *Sclerotium rolfsii* e a mancha alvo ou mancha-alvo causada por *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei são as principais doenças que limitam a produtividade das solanáceas em regiões tropicais. O Brasil, apesar de reunir as condições ambientais ideais para a proliferação dos principais patógenos do tomateiro, também oferece as variáveis ambientais necessárias para se ter êxito na produção do tomate que pode ser produzido a nível comercial em todas as regiões brasileiras. Patógenos como *R. solanacearum*, *C. cassiicola* e *S. rolfsii* por serem os mais importantes da cultura de tomateiro, estes são portanto alvos interessantes para o controle biológico. Portanto, esta pesquisa visou selecionar, identificar e avaliar *in vitro* e *in planta* bactérias antagonistas com potencial para desenvolvimento de bioinsumos que contribuam para o desenvolvimento agrícola sustentável contra os referidos patógenos. A triagem das bactérias antagonistas foi realizada com base em 60 isolados da coleção de microrganismos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, sendo selecionados os três isolados mais promissores para cada patógeno. No caso de *R. solanacearum* os isolados SOL 195, SOL 101.1 e PcA1. Para *C. cassiicola* os isolados PcA1, SOL 194 e SOL 195 e *S. rolfsii* os isolados PcA1, SOL 112 e SOL 101.1. Todos os isolados foram identificados com base na região 16 S do rDNA ou genoma completo e avaliados quanto ao biocontrole *in vitro* e *in planta*. A identificação molecular revelou que PcA1 com base em filogenômica pertence a espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, e os demais isolados foram identificados com base na identidade nucleotídica da região 16S em gênero: SOL 101.1 (*Bacillus* sp.), SOL 112 (*Bacillus* sp.), SOL 194 (*Microbacterium* sp.) e SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.). Os testes *in vitro* indicaram que o isolado SOL 195 obteve o maior percentual de inibição do crescimento de *R. solanacearum*, com 75,62% e apresentando aumento progressivo da atividade antagonista no decorrer do experimento. O isolado PcA1 manteve o maior percentual de inibição de crescimento do fungo *S. rolfsii* variando de 78,18% (sete dias) a 67,40% (21 dias). PcA1 também foi o mais eficiente contra *C. cassiicola* com 75,73% de inibição aos 21 dias. Nas avaliações *in planta* os isolados SOL 195, SOL 101.1 e PcA1 foram eficazes no biocontrole da murcha bacteriana em tomateiro. Os isolados SOL 101.1, SOL 112 e PcA1 foram ineficientes no controle da murcha de esclerócio independente se inoculado antes do patógeno (efeito preventivo) junto com o patógeno, ou após o estabelecimento da doença (efeito curativo). No biocontrole de *C. cassiicola*, os isolados SOL 195 e PcA1 foram os mais eficientes na redução da severidade da mancha-alvo quando utilizados de forma preventiva. E PcA1 foi o mais eficiente quando inoculado depois da doença estabelecida (efeito curativo).

**Palavras-chave:** Solanáceas, Bactérias, Severidade, Bioinsumos, Biocontrole.



## Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) belongs to the Solanaceae family and is native to the Andean region, comprising Peru, Bolivia and Ecuador. Among the fruits characterized as vegetables, tomato is the most consumed in the world, in addition to being a source of antioxidants, such as lycopene. However, several diseases of bacterial and fungal origin can compromise tomato production. Bacterial wilt caused by *R. solanacearum*, sclerotium wilt caused by *Sclerotium rolfsii* and target spot caused by *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei are the main diseases that limit the productivity of Solanaceae in tropical regions. Brazil, despite having the ideal environmental conditions for the proliferation of the main pathogens of tomato, also offers the necessary environmental variables to succeed in the production of tomato that can be produced commercially in all Brazilian regions. Pathogens such as *R. solanacearum*, *C. cassiicola* and *S. rolfsii*, as they are the most important in tomato crops, are therefore interesting targets for biological control. Therefore, this research aimed to select, identify and evaluate *in vitro* and *in planta* biocontrol based on antagonistic bacteria with potential for the development of bioinputs that contribute to sustainable agricultural development against these pathogens. The phytopathogen *C. cassiicola* and *S. rolfsii* were obtained from tomato plants showing symptoms of target spot and sclerotium wilt, respectively. The screening of antagonistic bacteria was performed based on 60 isolates from the collection of microorganisms from the Molecular Biology laboratory at Embrapa Amazônia Ocidental, with the three most promising isolates being selected for each pathogen. In the case of *R. solanacearum* the isolates SOL 195, SOL 101.1 and PcA1. For *C. cassiicola* the isolates PcA1, SOL 194 and SOL 195 and *S. rolfsii* the isolates PcA1, SOL 112 and SOL 101.1. All isolates were identified based on the 16S region or complete genome and evaluated for biocontrol *in vitro* and *in planta*. Molecular identification revealed that PcA1, based on phylogenomics, belongs to the species *Bacillus amyloliquefaciens*, and the other isolates were identified based on the nucleotide identity of the 16S region in genus: SOL 101.1 (*Bacillus* sp.), SOL 112 (*Bacillus* sp.), SOL 194 (*Microbacterium* sp.) and SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.). The *in vitro* tests indicated that the SOL 195 isolate obtained the highest percentage of inhibition of the growth of *R. solanacearum*, with 75.62% and showing a progressive increase in the antagonist activity during the experiment. The isolate PcA1 maintained the highest percentage of growth inhibition of the fungus *S. rolfsii*, ranging from 78.18% (seven days) to 67.40% (21 days). PcA1 was also the most efficient against *C. cassiicola* with 75.73% inhibition at 21 days. In the in-plant evaluations, the isolates SOL 195, SOL 101.1 and PcA1 were effective in the biocontrol of bacterial wilt in tomato. Isolates SOL 101.1, SOL 112 and PcA1 were ineffective in controlling sclerotium wilt independently if inoculated before the pathogen (preventive effect) along with the pathogen, or after the establishment of the disease (curative effect). In the biocontrol of *C. cassiicola*, the isolates SOL 195 and PcA1 were the most efficient in reducing the severity of the target spot when used preventively. In addition, PcA1 was the most efficient when inoculated after the established disease (curative effect).

**Keywords:** Solanaceae, Bacteria, Severity, Bioinputs, Biocontrol.

## SUMÁRIO

<b>1-Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2-Justificativa.....</b>	<b>15</b>
<b>3-Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1-Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2-Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>4-Material e Métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1-Obtenção dos fitopatogênicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2-Seleção de bactérias contra patógenos de tomateiro.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3-Análise da inibição <i>in vitro</i> de bactérias contra patógenos de tomateiro.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4-Identificação molecular dos antagonistas e patógenos.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5-Avaliação das bactérias em experimentos <i>in planta</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>4.5.1-Teste de bactérias contra <i>Ralstonia solanacearum</i> em tomateiro.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5.2-Teste de bactérias contra <i>Corynespora cassiicola</i> em tomateiro.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5.3-Teste de bactérias contra <i>S. rolfsii</i> em tomateiro.....</b>	<b>27</b>
<b>5-Resultados e Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1-Avaliação <i>in vitro</i> das bactérias contra patógenos de tomateiro.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2-Identificação molecular dos antagonistas e patógenos utilizados neste estudo.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2.1-Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3-Avaliação de bactérias antagonistas no controle de doenças de tomateiro...</b>	<b>35</b>
<b>5.3.1-Controle da murcha bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i>).....</b>	<b>35</b>
<b>5.3.2-Controle da murcha de esclerócio (<i>Sclerotium rolfsii</i>).....</b>	<b>41</b>
<b>5.3.3-Controle da mancha alvo (<i>Corynespora cassiicola</i>).....</b>	<b>44</b>
<b>6-Conclusões.....</b>	<b>49</b>
<b>7-Referências Bibliográficas.....</b>	<b>50</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Lista de isolados bacterianos utilizados para triagem de antagonista contra <i>Ralstonia solanacearum</i> (V20); <i>Corynespora cassiicola</i> (INPA 2671) e <i>Sclerotium rolfsii</i> (INPA 2941).....	18
<b>Tabela 2:</b> Resultado da análise físico-química do substrato comercial Tropstrato HT Hotaliças.....	23
<b>Tabela 3:</b> Médias em porcentagens de inibição da <i>Ralstonia solanacearum</i> em 15 dias de análises.....	28
<b>Tabela 4:</b> Médias de porcentagens de inibição de <i>Sclerotium rolfsii</i> em 21 dias de avaliação.....	29
<b>Tabela 5:</b> Médias de porcentagens de inibição de <i>C. cassiicola</i> x biocontroles entre 7 e 21 dias de avaliação.....	30
<b>Tabela 6:</b> Identificação molecular dos isolados utilizados neste estudo.....	32
<b>Tabela 7:</b> Médias de severidade da murcha bacteriana em tomateiro, causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> , após 30 dias de avaliação de biocontrole bacteriano.....	36
<b>Tabela 8:</b> Médias de severidades de murcha de esclerócio causada por <i>Sclerotium rolfsii</i> em relação a três bactérias avaliadas em relação aos efeitos preventivo, coinoculação e efeito curativo.....	41
<b>Tabela 9:</b> Médias de severidades do fungo <i>Corynespora cassiicola</i> em relação a três bactérias utilizadas para avaliar os efeitos preventivo, coinoculado e curativo .....	45

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Tomateiros Santa Cruz com 15 dias após a semeadura apresentando média de 15 cm de altura.....	24
<b>Figura 2:</b> Escala de notas para análise da severidade de <i>Corynespora cassiicola</i> em folíolos de tomateiro.....	25
<b>Figura 3:</b> Escala diagramática de notas para análise da severidade da murcha bacteriana proposta por Gomes (1997).....	25
<b>Figura 4:</b> Análise da inibição de <i>R. solanacearum</i> (V20-INPA) entre 2 e 10 dias em co-cultivo.....	29
<b>Figura 5:</b> Análise da inibição de 21 dias de <i>Sclerotium rolfsii</i> em co-cultivo.....	30
<b>Figura 6:</b> Análise da inibição de 21 dias de <i>Corynespora cassiicola</i> em co-cultivo.....	31
<b>Figura 7:</b> Em A e B <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Pc A1) apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	32
<b>Figura 8:</b> Em A e B <i>B. cabrialesii</i> (SOL112) apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	33
<b>Figura 9:</b> Em A e B <i>B. albus</i> (SOL 101.1) apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	33
<b>Figura 10:</b> Em A e B <i>M. resistens</i> (SOL 194) apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	33
<b>Figura 11:</b> Em A e B <i>S. maltophilia</i> (SOL 195) apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	34
<b>Figura 12:</b> Em A e B <i>C. cassiicola</i> apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	34
<b>Figura 13:</b> Em A e B <i>Sclerotium rolfsii</i> apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	34
<b>Figura 14:</b> Em A e B <i>Ralstonia solanacearum</i> apresentando aspectos morfológicos em MEV.....	35
<b>Figura 15:</b> Avaliação do efeito antagonista de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus</i> sp. e <i>Stenotrophomonas</i> sp. em tomateiros 12 dias após germinação.....	37
<b>Figura 16:</b> Avaliação do efeito antagonista de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus</i> sp. e <i>Stenotrophomonas</i> sp. em tomateiros 15 dia após inoculação do patógeno.....	38
<b>Figura 17:</b> Avaliação do efeito antagonista de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus</i> sp. e <i>Stenotrophomonas</i> sp. em tomateiros 35 dia após inoculação do patógeno.....	39
<b>Figura 18:</b> Avaliação do efeito preventivo dos isolados contra <i>S.rolfsii</i> .....	42
<b>Figura 19:</b> Avaliação do efeito coinoculado dos isolados contra <i>S.rolfsii</i> .....	43
<b>Figura 20:</b> Avaliação do efeito curativo dos isolados contra <i>S.rolfsii</i> .....	44
<b>Figura 21:</b> Avaliação do efeito preventivo dos isolados contra <i>Corynespora cassiicola</i> .....	46
<b>Figura 22:</b> Avaliação do efeito coinoculado dos isolados contra <i>Corynespora cassiicola</i> .....	47
<b>Figura 23:</b> Avaliação do efeito curativo dos isolados contra <i>Corynespora cassiicola</i> .....	48

## 1-Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), também conhecido como tomate ou jitomati pelos indígenas, pertence à família das solanáceas e é originário da região andina, compreendendo Peru, Bolívia e Equador (Camargo *et al.* 2006). Outros integrantes conhecidos da família Solanaceae são batata, berinjela, pimenta e pimentão. O consumo do tomate já era comum na América Central e do Sul antes da chegada dos europeus, despertando o interesse dos colonizadores no século XVI, em especial os espanhóis, para o cultivo nos seus países de origem, mas seu consumo foi difundido somente no século XIX (Morais 2017). Conforme Dahlke *et al.* (2019) e FAO (2019), dentre as frutas caracterizadas como hortaliças, o tomate é o mais consumido no mundo, além de ser fonte de antioxidantes, como o licopeno (Duma *et al.* 2015).

A safra brasileira de tomate, do ano de 2020, chegou ao patamar de 3,9 toneladas (3.956.559), mesmo com a retração de produção desde 2018. O maior produtor foi o Estado de Goiás com 32,4% da produção nacional, seguido de São Paulo com 21,1%, Minas Gerais com 19,7% e Paraná com 4,4% (IBGE 2021). A produção do tomateiro pode ser comprometida por diversas doenças de origem bacteriana e fúngica. Entre as bacterianas destaca-se a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) e entre as doenças fúngicas a murcha de esclerócio causada por *Sclerotium rolfsii* e a mancha alvo causada por *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei que são as responsáveis por causar prejuízos econômicos significativos não apenas em culturas de tomateiro, mas também em outras solanáceas que são amplamente cultivadas, tais como batata, berinjela, pimenta, pimentão entre outras espécies (Lopes 2009; Lopes e Rossato 2013; Rodrigues *et al.* 2018).

O clima do bioma da Amazônia é caracterizado por elevadas temperaturas e umidade relativa do ar (Fisch *et al.* 1998, Coutinho 2016), tal combinação resulta nas condições favoráveis para o desenvolvimento de diversas doenças, inclusive aquelas causadas por patógenos do solo, restringindo a produtividade agrícola na região. Na cultura do tomateiro, a murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*, a murcha de esclerócio causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc e a mancha alvo ou mancha de corynespora causada por *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei são as principais doenças que limitam a produtividade das solanáceas em regiões tropicais (Lima *et al.* 2010; Lopes *et al.* 2015).

De acordo com dados estatísticos de produção agrícola levantados pelo IBGE (2021), o Estado do Amazonas não apresenta produção de tomate em nível de relevância comercial o suficiente para que esteja dentre os estados produtores da região norte. Este fato pode estar relacionado as variáveis ambientais e aos fitopatógenos que interferem na produção das solanáceas no Estado. Neste contexto, a busca de práticas ecologicamente sustentáveis envolvendo a utilização de micro-organismos antagonistas têm mostrado potencial quanto a sua utilização para o controle de doenças (Lopes *et al.* 2015).

Um dos principais grupos utilizados no biocontrole são as actinobactérias, que foram por um período, de forma equivocada, classificadas como fungos, devido principalmente, ao seu comportamento de desenvolvimento reprodutivo micelial e estrutura de sua colônia muito parecida com colônias fúngicas. A palavra actinobactéria é derivada do grego “aktis” (traço) e “mykes” (fungo) (Oliveira *et al.* 2014). Há diversas variedades com organização filamentosa, ramificação radial e hifas. Porém, no geral as hifas são mais estreitas que as fúngicas (Lechevalier e Lechevalier, 1967; Semêdo, 1997; Olmos *et al.* 2013).

Patil *et al.* (2011) observaram que as actinobactérias promoveram crescimento de plantas e reduziram em 44,55% a incidência do tombamento de plântulas, causada por *Rhizoctonia solani*, em cultivo de tomateiro. De acordo com a pesquisa de Vergnes *et al.* (2020), as actinobactérias como as *Streptomyces* de solo podem se desenvolver na superfície das folhas de plantas e expor seu potencial quanto ao gerenciamento de doenças como, por exemplo, induzindo respostas de defesa e proteção contra patógenos fúngicos foliares. Desta maneira é importante concordar com Yamunarani e Pandiyan (2019) no tocante a execução de novas pesquisas utilizando actinobactérias com potencial de ser agentes promissores para o desenvolvimento de novos biofertilizantes e de biocontrole.

Quanto à utilização de bactérias no controle biológico de doenças de plantas, pode-se citar os trabalhos de Sahilah *et al.* (2010), onde cinco isolados de bactérias (todas caracterizadas e identificadas como *Streptomyces*) mostraram atividade antagonista a *R. solanacearum*. Em um outro estudo, esse realizado por Adhilakshmi *et al.* (2014), observaram que as sementes de amendoim tratadas com uma linhagem de *Streptomyces* sp., ocorriam aumento significativo no comprimento das raízes, parte aérea e no vigor das plântulas, bem como reduzia significativamente a incidência de podridão do caule, causada por *S. rolfsii*, tanto em cultivo

protegido quanto em cultivos de campo aberto. Thampi e Bhai (2017) utilizaram actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. e reduziram em 80,73 a 98.10% a incidência da doença causada por *S. rolfii* em pimenta preta.

De acordo com Melo *et al.* (2021) o controle biológico de doenças em plantas realizado por bactérias do gênero *Bacillus* tem mostrado efeito positivo em relação ao melhoramento da produtividade de lavouras. E conforme Leelasuphakul (2008) isto ocorre tanto por antagonismo direto envolvendo antibiose, competição por nutrientes e por espaço e através da produção de compostos orgânicos voláteis potencialmente nocivos ao agente patogênico quanto de acordo com Lanna Filho *et al.* (2010) por antagonismo indireto onde o *Bacillus* auxilia o sistema de defesa de resistência sistêmica induzida da própria planta contra a ação do fitopatógeno. Esta ação antagonica não ocorre somente contra microrganismos, pois, por exemplo, ocorre a diminuição gradativa da população do nematoide *Meloidogyne incognita* quando o tomateiro infestado por este fitopatógeno é tratado com suspensão bacteriana de *B. subtilis* (Voss 2013).

## **2-Justificativa**

O controle biológico de fitopatógenos realizado por bactérias pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como a coprodução de antibióticos, o parasitismo, a competição pelo espaço físico e/ou a indução de resistência ao ataque de patógenos (Oliveira *et al.* 2010). Assim as actinobactérias estão entre os grupos das Rizobactérias Promotoras do Crescimento em Plantas (RPCPs) mais importantes da rizosfera, pois se destacam por estimular o crescimento vegetal e minimizar ou retardar a invasão de micro-organismos patogênicos aos vegetais com os quais se associam ou se inter-relacionam (Beneduzi *et al.* 2013). Como também dentre os mecanismos indiretos para o biocontrole de micro-organismos fitopatogênicos podem, por exemplo, promover a indução de resistência à planta hospedeira, ajudando a planta na solubilização de fósforo e na produção de ácidos orgânicos como os ácidos cítricos, glucônico, láctico, málico e oxálico (Lanna Filho *et al.* 2010; Tamreihao *et al.* 2016).

A ação das bactérias no controle de agentes patogênicos sem dúvida pode ser uma realidade que acontece naturalmente desde o surgimento até a evolução das diversas espécies vegetais (Kuklinsky-Sobral *et al.* 2004; Mendes *et al.* 2013). Desta forma, a utilização desses

importantes agentes ambientais no controle de doenças em solanáceas, especialmente em cultivos de tomates se apresenta como uma instrumentação metodológica que no mínimo merece a atenção para ser experimentada, uma vez que o Brasil, apesar de reunir as condições ambientais ideais para a proliferação dos principais patógenos do tomateiro, também oferece as variáveis ambientais necessárias para se ter êxito na produção do tomate e, de acordo com o cultivar ou híbrido utilizado pode ser satisfatoriamente produzido a nível comercial em todas as regiões brasileiras, (Nguyen e Ranamukhaarachchi 2010). Sendo que o que limita tal produção é a infestação de doenças, principalmente de climas tropicais e subtropicais (Lopes 2009).

Embora *R. solanacearum*, *C. cassicola* e *S. rolfsii* sejam importantes patógenos do tomateiro e tenham ocorrido inúmeros avanços no controle de patógenos de diversas culturas agrícolas, ainda é escassa a utilização de agentes biológicos que realizam o controle desses patógenos no cultivo de tomate (Quezado-Duval *et al.* 2013). Desse modo, esta pesquisa visa identificar bactérias antagonistas que realizem a inibição do crescimento dos fitopatógenos, propiciando efeito protetivo ao hospedeiro e, que auxiliem no melhoramento da produção do tomate, bem como, sirva de fundamentação para o desenvolvimento de bioinsumos que contribuam para o desenvolvimento agrícola sustentável, bem como, contribuam para o desenvolvimento agrícola do Estado do Amazonas, assim como na qualidade de vida de diversos produtores e da sociedade consumidora no geral.

### **3-Objetivos**

#### **3.1-Objetivo Geral**

Selecionar e avaliar bactérias com potencial para controle biológico de patógenos do tomateiro (*S. lycopersicum*) visando o desenvolvimento de um bioproduto.

#### **3.2-Objetivos Específicos**

- 1- Isolar os patógenos do tomateiro: *R. solanacearum*, *C. cassicola* e *S. rolfsii*.



2- Realizar seleção de bactérias capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *R. solanacearum*, *C. cassiicola* e *S. rolfsii*.

3- Realizar a identificação molecular dos isolados selecionados.

4- Avaliar os efeitos das bactérias selecionadas no controle das doenças: murcha bacteriana, murcha de esclerócio e mancha alvo.

## **4-Material e Métodos**

### **4.1-Obtenção dos fitopatogênicos**

Os fitopatógenos *C. cassiicola* foi isolado de folhas de tomateiro apresentando sintomas característicos de mancha alvo e o isolamento de *S. rolfsii* foi obtido a partir de tomateiros apresentando sintomas de murcha de esclerócio, como murcha e lesão no colo da planta. As coletas foram realizadas na área de cultivo de tomate, na Estação Experimental de Hortaliças Dr. Alejo von Der Pahlen, KM 14 da estrada AM 010 (S: 02° 59' 45,7" e W: 60° 01' 22,3"), e levadas para o Laboratório de Fitopatologia do INPA. As lesões das folhas foram observadas sob microscópio estereoscópico e estruturas reprodutivas (conídios) do fungo associadas às lesões foram transferidas, com auxílio de um estilete de ponta fina, para placa de Petri contendo meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) (200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g ágar e 1 L de água). As placas foram mantidas em BOD a 25 °C, por cinco a sete dias e observadas diariamente. As hifas desenvolvidas foram repicadas para placas contendo BDA e mantidas em BOD a 25 °C por dez dias e armazenadas em refrigerador a 5 °C. Os isolados de *C. cassiicola* e *S. rolfsii* foram registrados na coleção de micro-organismos de interesse Agrossilvicultural do INPA com os números INPA 2671 e INPA 2941 respectivamente e posteriormente os isolados foram confirmados por técnicas de biologia molecular conforme descrito no item 4.4.

Já *R. solanacearum* foi obtida da coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, com a identificação V20 INPA. A bactéria foi reativada em meio de cultura Ágar TZC de Kelman (peptona 10 g L<sup>-1</sup>, ácido casamino 1 g L<sup>-1</sup>, ágar 15 g L<sup>-1</sup> e pH 7) e repicada em seguida em meio de cultura LPGA

(extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, peptona 5 g L<sup>-1</sup>, glucose 5 g L<sup>-1</sup>, ágar 15 g L<sup>-1</sup> e pH 7) sólido e líquido.

#### 4.2-Seleção de bactérias contra patógenos de tomateiro

As bactérias antagonistas foram selecionadas com base na técnica co-cultivo a partir de 60 bactérias da coleção de microrganismos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental (Tabela 1). Selecionadas quanto à atividade antagonista contra fitopatógenos de tomateiro, *R. solanacearum* (V20); *C. cassiicola* (INPA 2671) e *S. rolfsii* (INPA 2941). Esses isolados estavam armazenados no laboratório e foram reativados em meio de cultura BDA e mantidos em câmara de crescimento BOD a  $28 \pm 2$  °C sob regime de 12 h de luz. As triagens foram realizadas individualmente em placas de Petri de 90 x 15 mm com meio LPGa na atividade antagônica contra *R. solanacearum* e meio BDA na atividade antagônica contra *C. cassiicola* e *S. rolfsii*, mantidas em câmara BOD por 6 dias.

As avaliações realizadas por meio do bloco de gelose ou teste de difusão em ágar proposta por Ichikawa *et al.* (1971) no teste antagônico contra *R. solanacearum* e pela análise de cultura pareada de acordo com Bastos (1997) nos testes antagônicos contra *C. cassiicola* e *S. rolfsii*, a fim de identificar os três melhores antagonistas para cada fitopatógeno. Cada experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com apenas uma unidade amostral por tratamento. Os isolados mais promissores foram selecionados para seguirem para a próxima etapa de avaliação.

**Tabela 1-** Lista de isolados bacterianos utilizados para triagem de antagonista contra *Ralstonia solanacearum* (V20); *Corynespora cassiicola* (INPA 2671) e *Sclerotium rolfsii* (INPA 2941)

Nº	Código da Coleção	Origem	Local
01	Pc A1	Raízes de <i>Paullinia cupana</i>	Manaus
02	SOL 16.10	Sedimentos	Rio Solimões
03	SOL 21.2	Sedimentos	Rio Solimões
04	SOL 26.2	Sedimentos	Rio Solimões
05	SOL 27.1	Sedimentos	Rio Solimões
06	SOL 29.1	Sedimentos	Rio Solimões
07	SOL 30.3	Sedimentos	Rio Solimões
08	SOL 31.4	Sedimentos	Rio Solimões
09	SOL 32.4	Sedimentos	Rio Solimões
10	SOL 34.8	Sedimentos	Rio Solimões
11	SOL 35.1	Sedimentos	Rio Solimões
12	SOL 35.2	Sedimentos	Rio Solimões
13	SOL 35.7	Sedimentos	Rio Solimões
14	SOL 39.1	Sedimentos	Rio Solimões

15	SOL 39.2	Sedimentos	Rio Solimões
16	SOL 44A	Sedimentos	Rio Solimões
17	SOL 29.2	Sedimentos	Rio Solimões
18	SOL 48.3	Sedimentos	Rio Solimões
19	SOL 49.1	Sedimentos	Rio Solimões
20	SOL 61.1	Sedimentos	Rio Solimões
21	SOL 72.3	Sedimentos	Rio Solimões
22	SOL 99.1	Sedimentos	Rio Solimões
23	SOL 101.1	Sedimentos	Rio Solimões
24	SOL 112	Sedimentos	Rio Solimões
25	SOL 113	Sedimentos	Rio Solimões
26	SOL 116	Sedimentos	Rio Solimões
27	SOL 120	Sedimentos	Rio Solimões
28	SOL 122.1	Sedimentos	Rio Solimões
29	SOL 130	Sedimentos	Rio Solimões
30	SOL 155	Sedimentos	Rio Solimões
31	SOL 183	Sedimentos	Rio Solimões
32	SOL 184.2	Sedimentos	Rio Solimões
32	SOL 194	Sedimentos	Rio Solimões
33	SOL 195	Sedimentos	Rio Solimões
34	SOL 199	Sedimentos	Rio Solimões
35	SOL 203.1	Sedimentos	Rio Solimões
35	JUR 6A	Sedimentos	Rio Juruá
36	JUR 7C	Sedimentos	Rio Juruá
37	JUR 9J	Sedimentos	Rio Juruá
38	JUR 12A	Sedimentos	Rio Juruá
39	MAD 4	Sedimentos	Rio Madeira
40	MAD 34	Sedimentos	Rio Madeira
41	MAD 42	Sedimentos	Rio Madeira
42	MAD 51	Sedimentos	Rio Madeira
43	MAD 52	Sedimentos	Rio Madeira
44	MAD 57	Sedimentos	Rio Madeira
45	MAD 58	Sedimentos	Rio Madeira
46	MAD 66	Sedimentos	Rio Madeira
47	MAD 70	Sedimentos	Rio Madeira
48	MAD 100.3	Sedimentos	Rio Madeira
49	MAD 113	Sedimentos	Rio Madeira
50	MAD 122	Sedimentos	Rio Madeira
51	MAD 143	Sedimentos	Rio Madeira
52	MAD 144	Sedimentos	Rio Madeira
53	MAD 145	Sedimentos	Rio Madeira
54	MAD 146	Sedimentos	Rio Madeira
55	MAD 147	Sedimentos	Rio Madeira
56	MAD 149	Sedimentos	Rio Madeira
57	MAD 158	Sedimentos	Rio Madeira
58	MAD 189	Sedimentos	Rio Madeira
59	MAD 100.3	Sedimentos	Rio Madeira
60	MAD 202	Sedimentos	Rio Madeira

As três bactérias que obtiveram os melhores resultados para cada fitopatógeno foram selecionadas para verificar a inibição de crescimento dos mesmos.

#### 4.3-Análise da inibição *in vitro* de bactérias contra patógenos de tomateiro

Nessa etapa foram conduzidos três experimentos em DIC, com três repetições para cada tratamento, sendo que cada placa de Petri foi considerada uma unidade experimental. No primeiro experimento foi avaliado a atividade de inibição do crescimento de *R. solanacearum* com base nos isolados SOL 195, SOL 101.1 e PcA1 selecionados no item 4.2. No segundo foram testados os isolados PcA1, SOL 194 e SOL 195 contra *C. cassiicola* e no terceiro os isolados PcA1, SOL 112 e SOL 101.1 contra *S. rofsii*.

A análise de antagonismo contra *R. solanacearum* ocorreu de forma que cada placa contendo meio LPGA recebeu um arraste bacteriano da *R. solanacearum* de aproximadamente 3 cm de comprimento por 2 mm de largura na posição horizontal a uma distância aproximada de 1,5 cm em relação a região central do antagonista disposta na posição vertical com aproximadamente 5 cm de comprimento por 2mm de largura. Tendo por base o método modificado de raia cruzada proposto por Velho- Pereira e Kamat (2011) as avaliações foram realizadas a cada dois dias até o décimo dia (PI<sub>2d</sub>, PI<sub>4d</sub>, PI<sub>6d</sub>, PI<sub>8d</sub> e PI<sub>10d</sub> de acordo com a seguinte fórmula matemática:

$$PAAEA (\%) = \frac{AIC}{ATCP} \times 100$$

Sendo:

PAAEA – Porcentagem de atividade antagônica específica da ação.

AIC – Área com inibição sob controle.

ATCP – Área total de crescimento do patógeno.

No segundo e terceiro experimento, um disco de 3 mm de diâmetro foi retirado após 72 h de cultivo do fitopatógeno de interesse e transferido no centro da placa de Petri contendo meio BDA e a aproximadamente 2 cm de distância foram feitos dois arrastes com as bactérias com aproximadamente 2 mm de largura por 3 cm de comprimento (um de cada lado). O controle consistiu do cultivo do fitopatógeno na ausência do antagonista. As placas foram mantidas em câmara de crescimento BOD a  $28 \pm 2$  °C sob regime de 12 h de luz. As avaliações foram realizadas a cada sete dias até o vigésimo primeiro dia (PI<sub>7d</sub>, PI<sub>14d</sub>, PI<sub>21d</sub>). A partir das medições

foi calculado o percentual de inibição de crescimento micelial (ICM) dos fungos patogênicos de acordo com a fórmula matemática abaixo descrita por Bastos (1997).

$$\text{ICM (\%)} = \frac{(T - t)}{T} \times 100$$

Onde:

ICM – inibição do crescimento micelial.

T – diâmetro de crescimento do controle.

t – diâmetro da colônia fúngica na placa de Petri.

Os antagonistas selecionados pelo método modificado de raia cruzada e pelo método de cultura pareada realizados *in vitro* foram avaliados em experimentos conduzidos em casa de vegetação.

#### 4.4-Identificação molecular dos antagonistas e patógenos

As cinco bactérias antagonistas selecionadas no tópico 4.3: PcA1, SOL 101.1, SOL 112, SOL 194 e SOL 195 foram cultivadas em meio líquido de ISP2 (3 g de extrato de malte, 3 g de extrato de levedura, 10 g de dextrose, 1 L de água destilada, pH 6,2) por 48 horas a 37 °C e a fitobactéria *R. solanacearum* (INPA V20) foi cultivada em meio líquido de LPG (extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, peptona 5 g L<sup>-1</sup>, glicose 5 g L<sup>-1</sup> e pH 7) por 48 horas a 28 °C. Em seguida, foram centrifugadas para obtenção da massa bacteriana. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit de purificação Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendações do fabricante.

A identificação molecular das bactérias foi conduzida pela amplificação de fragmentos do RNA ribossomal 16S (16S rRNA), utilizando o primer P027F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Os isolados fúngicos INPA 2941 e INPA 2671 utilizados neste trabalho foram identificados com os primers ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e NL4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White et al., 1990; Hermosa et al., 2000; Kumarae e Sousa, 2002). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µl, contendo: 50 ng de DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X buffer de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase. O termociclador foi programado para desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento 55 °C por 60 seg, alongação a 72 °C por 1,5 min.

Elongação final a 72 °C por 5 min. Os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) com marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen), revelados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV light usando o Molecular Imaging System (Loccus Biotecnologic L-Pix. Chemi).

Os produtos de PCR também foram purificados com PEG 20% e incubados em termociclador por 15 minutos a 37 °C (Applied Biosystems) para serem usados nas reações de sequenciamento que foram conduzidas para o volume de 10 µl (5 µl produto de PCR purificado, 2 µl de Bigdye v 3.1 (Thermo Fisher), 2 µl do buffer 5 X (Applied Biosystems) e 3,2 pmol de cada primer. O termociclador foi programado para 96 °C por 4 min, seguido por 30 ciclos a 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. As reações de sequenciamento foram analisadas no sequenciador Genetic Biosystems 3500 (Applied Biosystems/Hitachi).

A identificação das bactérias do presente estudo foi conduzida pela análise filogenética com base nas sequências obtidas juntamente com sequências do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih>). As sequências individuais foram alinhadas com o software Clustal W (Thomson et al. 1994) para a obtenção da árvore filogenética no programa MEGA v.11 (Kumar et al. 2021). A topologia da árvore foi avaliada por meio da análise de bootstrap usando 1000 reamostragens.

#### **4.5-Avaliação das bactérias em experimentos *in planta***

O parâmetro avaliado *in planta* foi a severidade da doença, visto que conforme Vale *et al.* (2004) quantificar a severidade da doença na planta é mais simples e rápido em relação à quantificar a incidência de doenças em plantas, mesmo porque este é o método adequado a ser aplicado na análise de doenças de solo, viroses sistêmicas e patologias que causam danos diretos ao produto final em vegetais. Bem como pela severidade se observa o grau de dano da doença na planta e a incidência se avalia a quantidade de plantas ou espécies infectadas. E neste estudo a finalidade foi avaliar a possibilidade de biocontrole bacteriano em relação ao dano que fitopatógeno causa na planta.

Experimentos visando avaliar o controle dos patógenos de tomateiro utilizando bactérias pré-selecionadas foram conduzidos em casa de vegetação na Estação Experimental de Hortaliças, Dr Alejo Von Der Pahlen do INPA (Rodovia AM 010, km 14, Manaus-AM).

O controle da doença de acordo com cada fitopatógeno foi estudada em três experimentos independentes. No experimento para se analisar o efeito preventivo, o putativo biocontrolador foi inoculado 5 dias antes do fitopatógeno. No experimento para se analisar o efeito simultâneo do patógeno e controlador (coinoculaç), isolados utilizados para avaliar o biocontrole foram inoculados concomitantemente ao fitopatógeno. E para avaliar o efeito curativo o biocontrole foi inoculado quando a doença estava iniciando os sintomas na planta.

De forma geral para todos os experimentos no tratamento 1 foi inoculado somente o patógeno sem o isolado biocontrole, sendo chamando de controle positivo. No tratamento 5 foi inoculado somente água estéril sem a presença tanto do biocontrole quanto do patógeno, sendo chamado de controle negativo. E nos tratamentos 2, 3 e 4 foi testado a possibilidade de controle da doença conforme os três isolados bacterianos selecionados nos testes *in vitro* contra cada fitopatógeno.

As três bactérias selecionadas quanto ao potencial inibitório contra cada fitopatógeno foram testadas para controle da doença no tomateiro em experimentos independentes. Os extratos bacterianos foram obtidos por meio do crescimento em meio de cultura ISP2 líquido, sob agitação mecânica de 200 rpm por até 24 horas, tendo a densidade ótica ajustada para  $A_{540}=0,5$  (concentração aproximada de  $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ) (Rocha e Moura 2013). Em seguida, centrifugado a 7800 rpm por 6 minutos a  $15^\circ\text{C}$  em centrífuga (eppendorf Centrifuge 5430 R) e a massa bacteriana diluída em água estéril.

Nos experimentos foi utilizado o substrato comercial Tropstrato HT Hortalíça que após ser autoclavado foi submetido à análise química de acordo com Donagema *et al.* (2011), cujos resultados estão descritos na tabela 2. O substrato foi autoclavado a  $120^\circ\text{C}$  a 1 atm por três dias seguidos com uma hora de autoclavagem por dia e intervalo de 23 horas entre as esterilizações. Obedecendo ao tempo total de autoclavagem de 3 horas para obtenção de um substrato estéril (Makishima e Carrijo 1998).

**Tabela 2** – Resultado da análise química do substrato comercial Tropstrato HT Hortalíças.

pH	N	P	K	Ca	Mg	Al	Fe	Zn	Mn
H <sub>2</sub> O	g $\text{kg}^{-1}$	mg $\text{kg}^{-1}$	-----cmolc $\text{kg}^{-1}$ -----	-----mg $\text{kg}^{-1}$ -----					
5,97	4,97	1,03	4,18	21,85	9,27	0,04	373,56	83,79	287,47

A semeadura da cultivar de tomate Santa Cruz (Figura 1) que possui características ideais para a condução de testes de patogenicidade, tais como suscetibilidade a várias doenças

e ciclo de vida de aproximadamente 120 dias, foi feita diretamente nos copos plásticos de 500 mL contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças, Uma fertirrigação com 50 mL de N-P-K (Plantafol 20:20:20) na concentração de  $2\text{g L}^{-1}$  foi realizada 72 horas antes da semeadura.

**Figura 1:** Tomateiros Santa Cruz com 15 dias após a semeadura apresentando em média de 15 cm de altura.



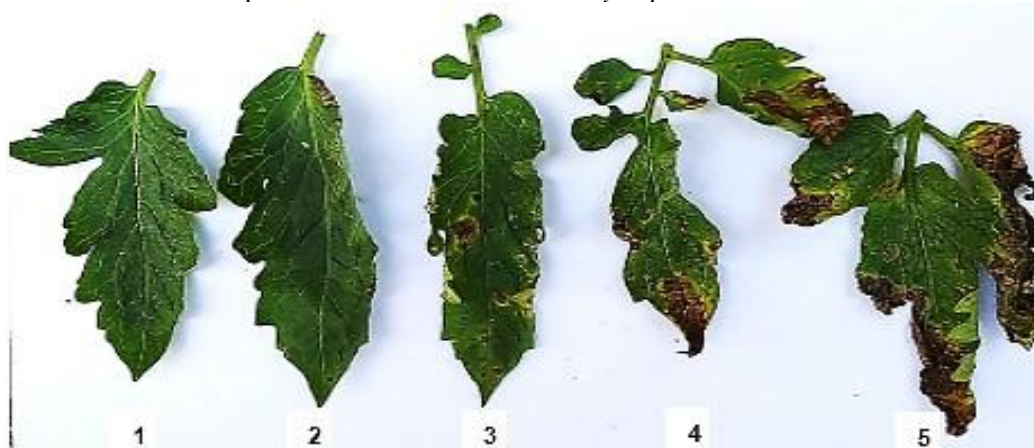
Fonte: Monteiro, 2021.

Durante a condução dos experimentos foram feitas duas irrigações em aspersão por dia por um período de 15 minutos cada, sendo de forma mecanizada e automatizada. A partir do trigésimo dia após a semeadura, além das irrigações automáticas foram realizadas duas irrigações manuais com 50 mL de água direto na unidade experimental. A cada sete dias as unidades experimentais foram fertirrigadas (Carrijo *et al.* 2005) com 50 mL de Plantafol 20:20:20, diluído em água natural e obedecendo à quantidade de  $2\text{g L}^{-1}$ .

A quantificação da severidade da mancha-alvo causada pelo fungo *C. cassiicola* foi feita a cada cinco dias, com base na escala diagramática de notas para análise da severidade da mancha-alvo proposta por Costa (2012) que estabelece as seguintes notas: 1 = folíolo sadio; 2 = Severidade baixa, até 10% do tecido lesionado; 3 = Severidade média, 11 a 20% do tecido lesionado; 4 = Severidade média-alta, 21 a 40% do tecido lesionado; 5 = Severidade alta, acima de 40% com grandes áreas necrosadas. De acordo com Campbell e Greaves (1990), a incidência não é o melhor nem o parâmetro adequado a ser analisado para avaliar doenças que apresentam manchas foliares como sintomas, sendo, portanto, a severidade o mais adequado e apropriado parâmetro de notas a ser utilizado. Isto porque a porcentagem da área de tecido recoberto por sintomas reflete melhor a quantidade de doença.



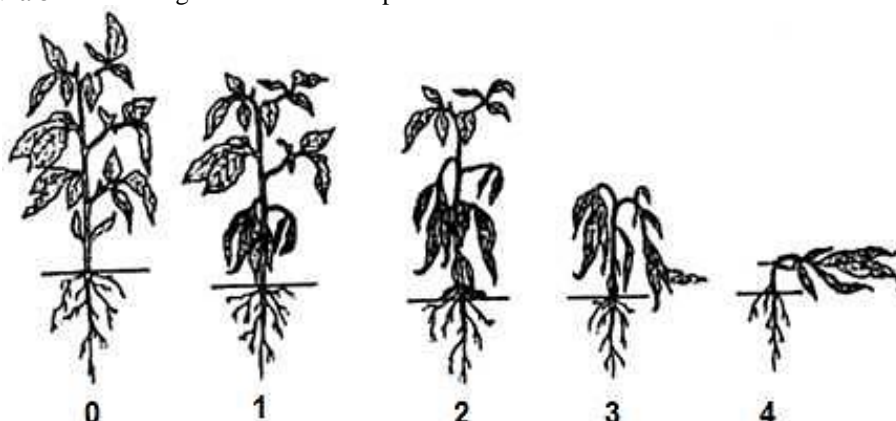
**Figura 2:** Escala de notas para análise da severidade de *Corynespora cassiicola* em folíolos de tomateiro.



Fonte: Costa (2012) com adaptações desta pesquisa. 1 – Folíolo sadio. 2 – Severidade baixa, até 10% do tecido lesionado. 3 – Severidade média, 11 a 20% do tecido lesionado. 4 – Severidade média-alta, 21 a 40% do tecido lesionado. 5 – Severidade alta, acima de 40% com grandes áreas necrosadas.

A quantificação da severidade da doença murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e da doença murcha de esclerócio foram feitas a cada 5 dias com base na escala diagramática de severidade da doença proposta por Gomes (1997) (Figura 3) que estabelece escala para estimar a severidade da doença baseada na análise qualitativa do estado da planta, com o seguinte critério: 0 = ausência de sintomas; 1 = planta com 1/3 das folhas murchas; 2 = planta com 2/3 das folhas murchas; 3 = planta totalmente murcha; 4 = planta morta. Pois ambas as doenças apresentam similaridade em relação aos sintomas na região apical foliar e ao tombamento da planta.

**Figura 3:** Escala diagramática de notas para análise da severidade da murcha bacteriana.



Fonte: Gomes (1997).

Para verificar a diferença nos tratamentos de todos os agentes patogênicos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e subsequentemente realizado o teste de Tukey a 5% de

probabilidade. As análises foram conduzidas utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira 2019).

#### **4.5.1-Teste de bactérias contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**

Cada experimento foi composto por cinco tratamentos assim descritos: Tratamento 1 representa o controle positivo (Solo infestado com *R. solanacearum* e sem antagonista); Tratamento 2 isolado SOL 195; Tratamento 3 isolado SOL 101.1; Tratamento 4 isolado PcA1. As plantas foram inoculadas com as bactérias incorporadas ao substrato e com *R. solanacearum*. O tratamento 5 representa o controle negativo (plantas não inoculadas nem com bactérias nem com patógeno apenas com água autoclavada).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com oito repetições por tratamento e cada tratamento repetido três vezes totalizando 120 unidades experimentais por experimento e 360 plantas avaliadas nos três experimentos. Para a inoculação de *R. solanacearum* foram feitos cortes com bisturis estéreis circundando o colo do tomateiro a uma distância de aproximadamente 2 cm do colo de forma que causasse poucas e pequenas lesões em algumas raízes da planta. Tais lesões foram feitas para que a bactéria patogênica tivesse facilidade de penetrar no tecido vegetal. Depois de realizados os cortes no solo, foram irrigados com 5 mL da solução contendo *R. solanacearum* em H<sub>2</sub>O autoclavada, que teve previamente a densidade ótica ajustada para  $A_{600} = 0,5$  com concentração de  $10^8$  ufc L<sup>-1</sup> (Rocha e Moura 2013). Esta mesma técnica foi utilizada para a inoculação dos agentes biocontroladores de acordo com cada experimento deste estudo.

A quantificação da severidade da doença murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* foi feita a cada 5 dias com base na escala diagramática de severidade da doença proposta por Gomes (1997).

#### **4.5.2-Teste de bactérias contra *Corynespora cassiicola* em tomateiro**

O potencial antagonista das três bactérias selecionadas pelo método de cultura pareada foi avaliado em experimentos conduzidos em casa de vegetação. Testou-se o potencial antagonista dos isolados SOL 195.1, SOL 194.1 e Pc A1 aspergidos contra o fitopatógeno *C. cassiicola* em três diferentes experimentos conforme descrito no item 4.5.

Cada experimento foi composto por cinco tratamentos assim descritos: Tratamento 1, Controle positivo (Plantas inoculadas com *C. cassiicola* e sem antagonista); Tratamento 2 isolado PcA1; Tratamento 3 isolado SOL 194; Tratamento isolado 4 SOL 195; e Tratamento 5 representa o controle negativo (plantas inoculadas somente com água autoclavada).

Os experimentos foram conduzidos em DIC com cinco repetições por tratamento, sendo 25 unidades experimentais em cada experimento e 75 plantas avaliadas nos três experimentos. As inoculações de *C. cassiicola* nos tomateiros foram realizadas quando as plantas apresentavam quatro folhas verdadeiras. Este fungo foi inoculado por aspersão de 10 mL da solução contendo uma suspensão calibrada em  $10^5$  conídio mL<sup>-1</sup> (câmara de Neubauer) na região foliar de cada unidade experimental delineada para o recebimento do fitopatógeno (Teramoto *et al.* 2013). Sendo que em cada unidade experimental cinco folíolos de cada uma das três últimas folhas compostas da região apical receberam cinco picadas com uma agulha estéril para facilitar a entrada do patógeno no tecido vegetal. Esta mesma técnica foi utilizada para a inoculação dos agentes biocontroladores.

A quantificação da severidade da doença mancha-alvo foi feita com base na escala diagramática de notas para análise da severidade de *Corynespora cassiicola* em folíolos de tomateiro proposta por Costa (2012).

#### **4.5.3-Teste de bactérias contra *S. rolfsii* em tomateiro**

Cada experimento foi composto por cinco tratamentos assim descritos: Tratamento 1 representou o controle positivo (plantas inoculadas com *S. rolfsii* e sem antagonista); Tratamento 2 isolado PcA1; Tratamento 3 isolado SOL 112; Tratamento 4 isolado SOL 101.1; e Tratamento 5 representa o controle negativo (plantas não inoculadas nem com patógeno e nem com antagonista, apenas com água destilada e autoclavada).

Os experimentos foram conduzidos em (DIC) com cinco repetições por tratamento. Também 25 unidades experimentais em cada experimento e 75 plantas avaliadas nos três experimentos. Para as inoculações com *S. rolfsii* foram utilizados grãos de arroz beneficiados e submersos em água destilada por duas horas, sendo que em seguida foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Ao esfriar foram distribuídos sobre colônias de *S. rolfsii* crescidas em placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), sendo incubadas a 25 °C em regime

de fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Os grãos de arroz que estavam totalmente colonizados após esse período foram incorporados e homogeneizados ao substrato dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 das mudas nos copos plásticos de 500 mL. De forma que foi obedecida a concentração de 4 g de arroz parboilizado colonizado para cada copo nos respectivos tratamentos (Barbosa *et al.* 2010).

Cada antagonista teve previamente a densidade ótica ajustada para  $A_{600} = 0,5$  (concentração aproximada de  $10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) e ressuspendidas em H<sub>2</sub>O autoclavada (Rocha e Moura 2013), sendo que cada unidade experimental foi irrigada com 5 mL desta solução.

As avaliações foram realizadas a cada 5 dias até 35 dias após a inoculação das bactérias nas mudas, de maneira que foram realizadas 6 avaliações, sendo que a cada 24 horas foram contabilizadas as plantas com sintomas de necrose e constrição do colo devido a infecção do *S. rolfsii* (Barbosa *et al.* 2010).

A quantificação da severidade da doença murcha de esclerócio causada por *S. rolfsii* foi feita a cada 5 dias com base na escala diagramática de severidade da doença proposta por Gomes (1997)

## 5-Resultados e Discussão

### 5.1-Avaliação *in vitro* das bactérias contra patógenos de tomateiro

As avaliações *in vitro* foram realizadas contra *R. solanacearum*, *S. rolfsii* e *C. cassiicola* e os isolados mais eficientes apresentaram inibição de 75,62; 72,83 e 75,73%, respectivamente.

As bactérias selecionadas contra *R. solanacearum*, SOL 195 e PcA1, apresentaram os maiores percentuais de inibição (Tabela 3) e (Figura 4).

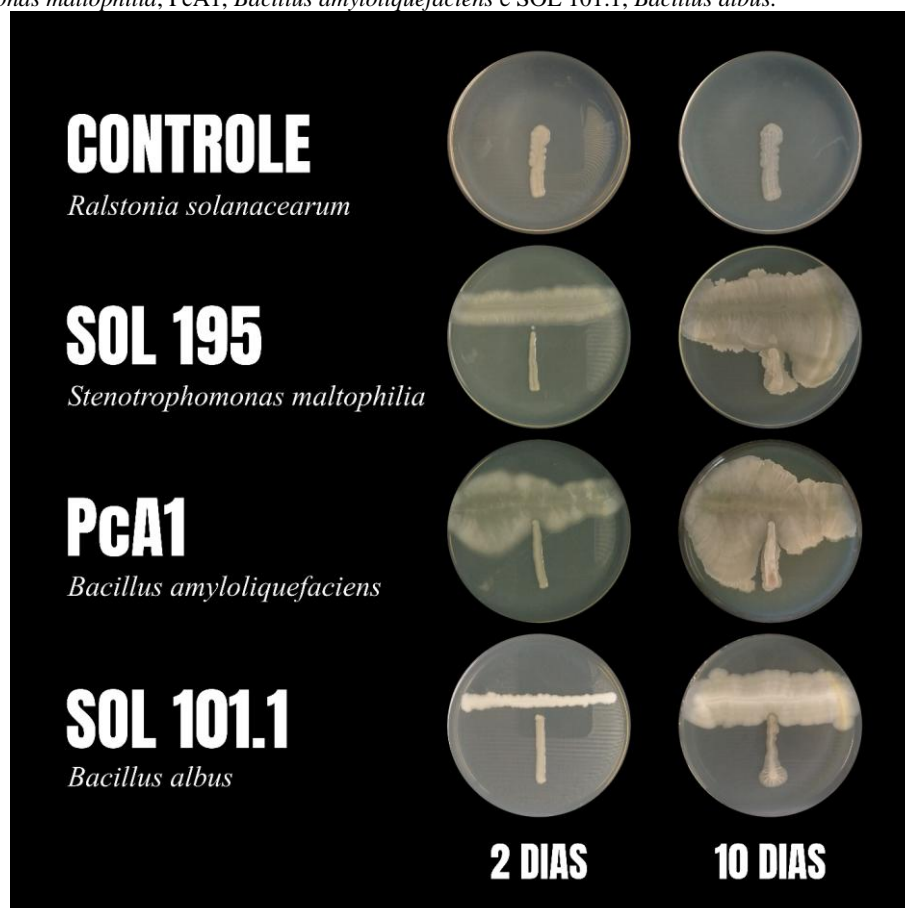
**Tabela 3:** Médias em porcentagens de inibição da *Ralstonia solanacearum* de 2 a 10 dias de análises.

Isolados bacterianos	Inibição 2 dias	Inibição 4 dias	Inibição 6 dias	Inibição 8 dias	Inibição 10 dias
<b>SOL 195.1</b>	26,66 a	48,24 a	62,06 a	70,08 b	75,62 b
<b>Pc A1</b>	17,14 a	39,47 a	55,16 a	58,26 ab	71,42 ab

<b>SOL 101.1</b>	13,32 a	16,66 b	16,37 a	14,52 a	24,36 a
<b>CV (%)</b>	59,81	14,92	41,20	39,50	33,38
<b>DMS</b>	28,52	12,99	45,94	47,10	47,76

Medidas de tratamentos seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação. DSM: Desvio médio de significância.

**Figura 4:** Análise da inibição de *R. solanacearum* (V20-INPA) entre 2 e 10 dias em co-cultivo contra os isolados SOL 195, *Stenotrophomonas maltophilia*, PcA1, *Bacillus amyloliquefaciens* e SOL 101.1, *Bacillus albus*.



Fonte: Monteiro, 2022.

Contra *S. rolfsii* o isolado PcA1 obteve 78,18% de inibição, seguido de SOL 112 com 48,51% e do SOL 101.1 com 40,36%. O isolado PcA1 mesmo com decrescente atividade antagonista manteve a maior média de inibição do fungo *S. rolfsii* com 72,83%, isto em relação às demais bactérias analisadas (Tabelas 4) e (Figura 5).

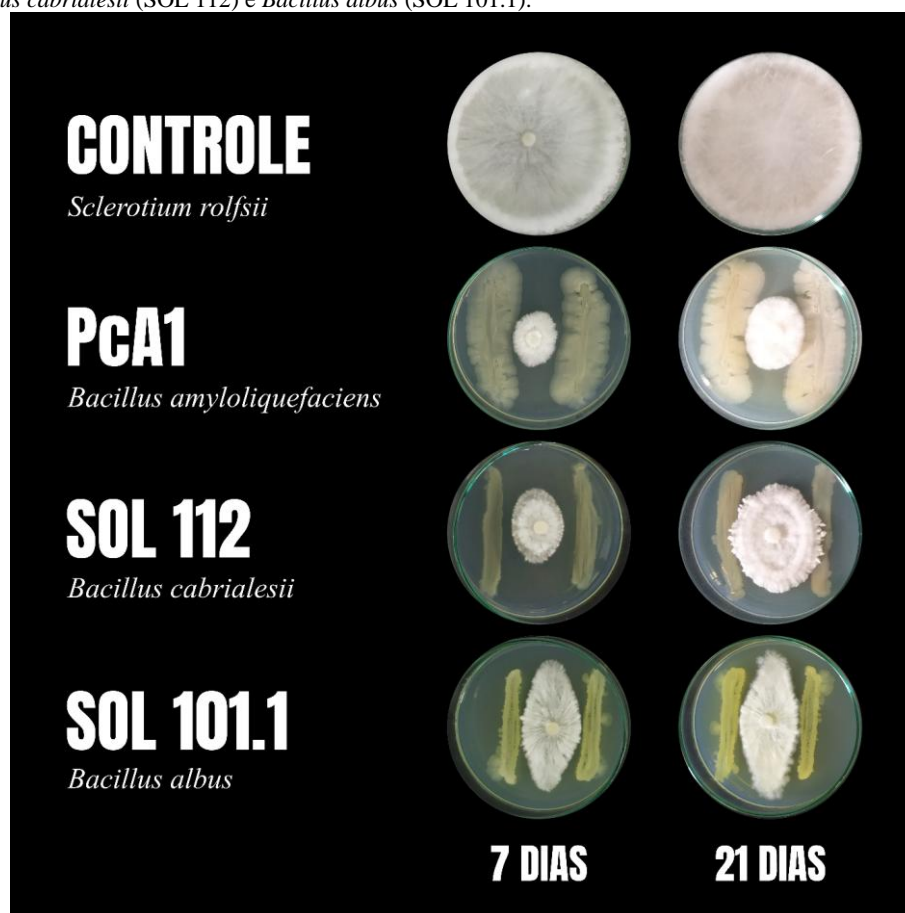
**Tabela 4:** Médias de porcentagens de inibição de *Sclerotium rolfsii* entre 7 e 21 dias de avaliação.

Isolado bacteriano	Inibição 7 dias	Inibição 14 dias	Inibição 21 dias	Inibição geral
<b>SOL 101.1</b>	40,36 b	27,22 b	28,14 b	31,91 b
<b>SOL 112</b>	48,51 b	33,51 b	18,88 b	33,63 b
<b>Pc A1</b>	78,18 c	72,58 c	67,40 b	72,83 c

<b>CV (%)</b>	15,69	33,53	52,57	30,48
<b>DMS</b>	21,88	37,31	50,21	35,20

Medidas de tratamentos seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação. DSM: Desvio médio de significância.

**Figura 5:** Análise da inibição de 21 dias de *Sclerotium rolfsii* em co-cultivo contra os isolados *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1); *Bacillus cabrialesii* (SOL 112) e *Bacillus albus* (SOL 101.1).



Fonte: Monteiro, 2022.

Contra o fitopatógeno *C. cassiicola* o isolado SOL 194 apresentou 66.54% de inibição aos 7 dias. Seguido do Pc A1 com média de inibição de 60,74% e do SOL 195 com média de 58,69% de inibição. Nas análises do percentual de antagonismo de 14 dias o Pc A1 apresentou a maior média de inibição com 70,20%, seguido da bactéria SOL 194 com 65% de inibição. Com 21 dias também foi o Pc A1 que permaneceu de forma progressiva com a maior média de inibição 75,73% (Tabela 5) e (Figura 6).

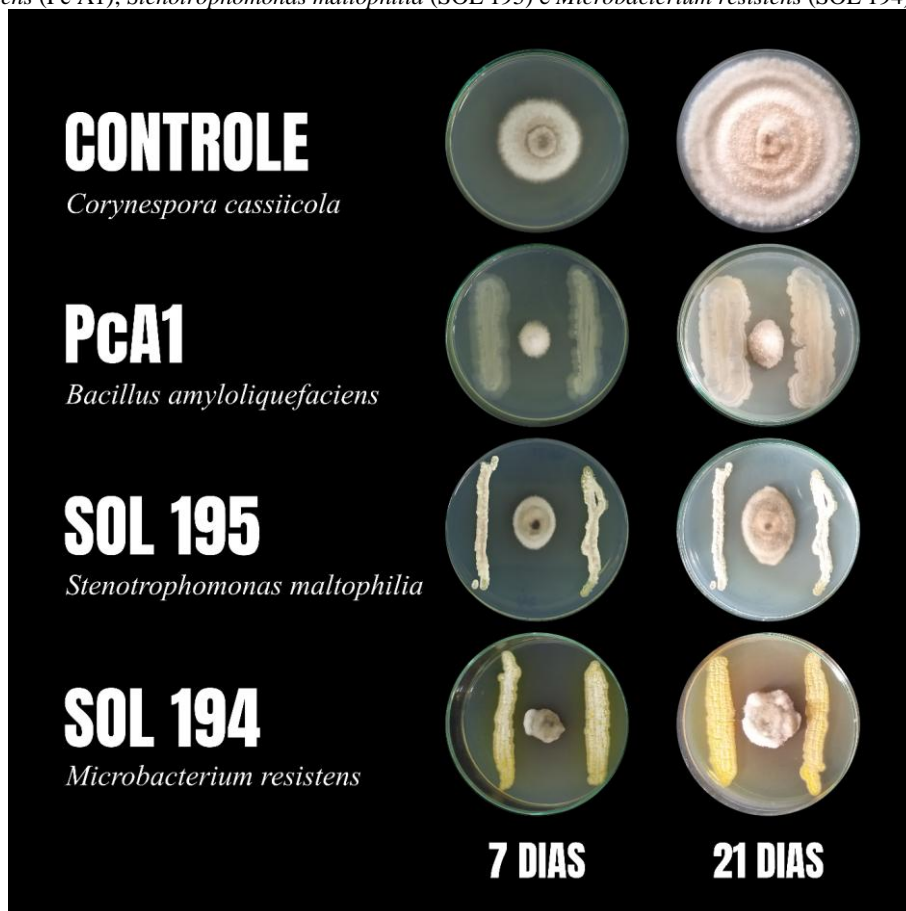
**Tabela 5:** Médias de porcentagens de inibição de *Corynespora cassiicola* entre 7 e 21 dias de avaliação.

Isolado bacteriano	Inibição 7 dias	Inibição 14 dias	Inibição 21 dias	Inibição geral
<b>SOL 195</b>	58,69 b	63,35 b	61,47 b	61,17 b
<b>Pc A1</b>	60,74 b	70,20 b	75,73 b	68,89 b
<b>SOL 194</b>	66,54 b	65,00 b	59,25 b	63,60 b

<b>CV (%)</b>	9,91	10,46	16,25	11,04
<b>DMS</b>	15,38	17,33	20,88	17,84

Medidas de tratamentos seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação. DSM: Desvio médio de significância.

**Figura 6:** Análise da inibição de 21 dias de *Corynespora cassiicola* em co-cultivo contra os isolados bacterianos: *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1); *Stenotrophomonas maltophilia* (SOL 195) e *Microbacterium resistens* (SOL 194).



Fonte: Monteiro, 2022.

## 5.2-Identificação molecular dos antagonistas e patógenos utilizados neste estudo

Com base na triagem realizada com 60 isolados foram selecionadas cinco bactérias: PcA1, SOL 101.1, SOL 112, SOL 194 e SOL 195, que mostraram potencial para inibir o crescimento dos patógenos *R. solanacearum* (isolado V20), *S. rolfii* (isolado INPA 2941) e *C. cassiicola* (isolado INPA 2671) de tomateiro. Todos os cinco antagonistas pré-selecionados e os três fitopatógenos foram submetidos à identificação molecular e os resultados são apresentados na tabela 6.

Na análise molecular com base no genoma completo do isolado PcA1 e da região 16 das demais bactérias, revelou que PcA1 pertence a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* com



base no dDDH acima de 70%, o isolado SOL 101.1 apresentou alta identidade com *Bacillus albus*, o isolado SOL 112 com *Bacillus cabrialesii*, SOL 194 apresentou 87,99% de identidade com *Microbacterium resistens* e o isolado SOL 195 com 96,44% como *Stenotrophomonas maltophilia*.

**Tabela 6:** Identificação molecular dos isolados utilizados neste estudo.

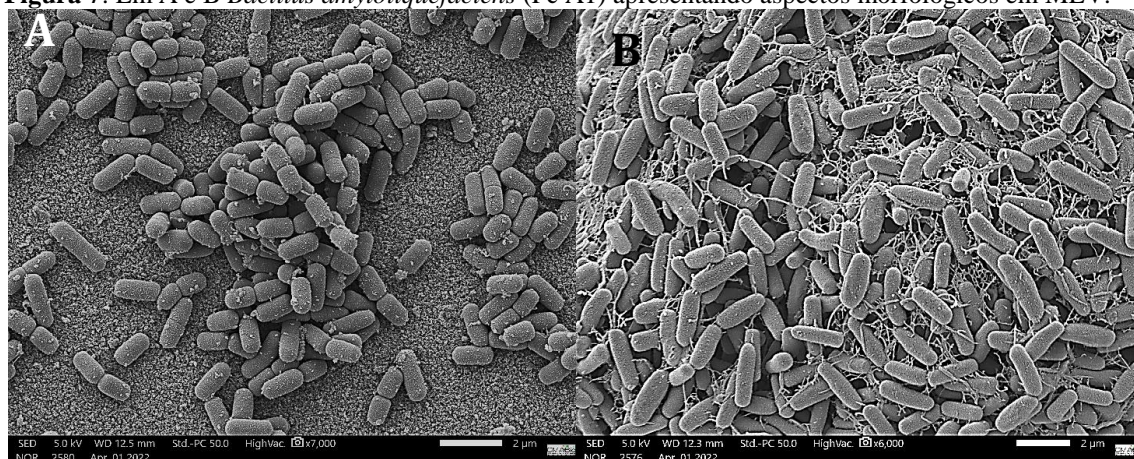
Isolado	Barcode	Id(%)	N de acesso	Identificação
PcA1	16S rDNA	96,54	OM541330.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain GR5B-21
SOL 101.1	16S rDNA	100	MW355880.1	<i>Bacillus albus</i> strain HBU7253
SOL 112	16S rDNA	98,40	OM422624.1	<i>Bacillus cabrialesii</i> strain L1C5T
SOL 194	16S rDNA	87,99	KF703723.1	<i>Microbacterium resistens</i> strain EAAG97
SOL 195	16S rDNA	96,44	KX350046.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain F3-2-41
<i>R. solanacearum</i> (V20)	16S rDNA	97,00	CP034196.1	<i>R. solanacearum</i> strain UA-1611
<i>S. rolsii</i> (INPA 2941)	ITS	99,54	MN872304.1	<i>Sclerotium rolsii</i> isolate Kale078
<i>C. cassicola</i> (INPA 2671)	ITS	99,58	MT470606.1	<i>Corynespora cassicola</i> strain HEV244L

Fonte: NCBI, 2022.

### 5.2.1-Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A estrutura morfológica dos isolados estudados neste trabalho foram avaliadas por meio de MEV, os isolados Pc A1, SOL 112 e SOL 101.1 identificados como *Bacillus* confirmam o aspecto bacilar conforme esperado (Figura 7-9). Os actinomicetes *Microbacterium* sp. (SOL 194), o gênero *Stenotrophomonas* (SOL 195) considerado grupo raro apresentaram aspecto filamentososo conforme esperado.

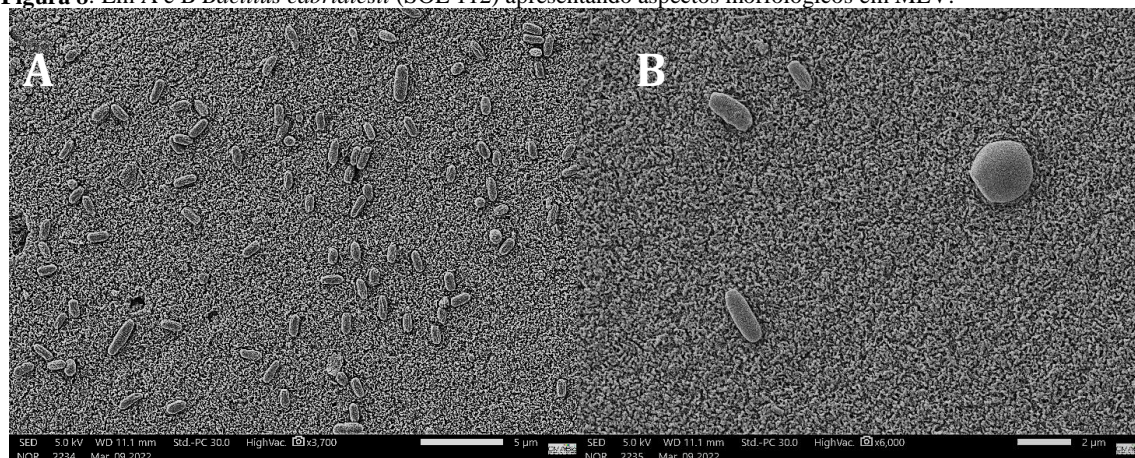
**Figura 7:** Em A e B *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1) apresentando aspectos morfológicos em MEV.



Fonte: Monteiro, 2022.

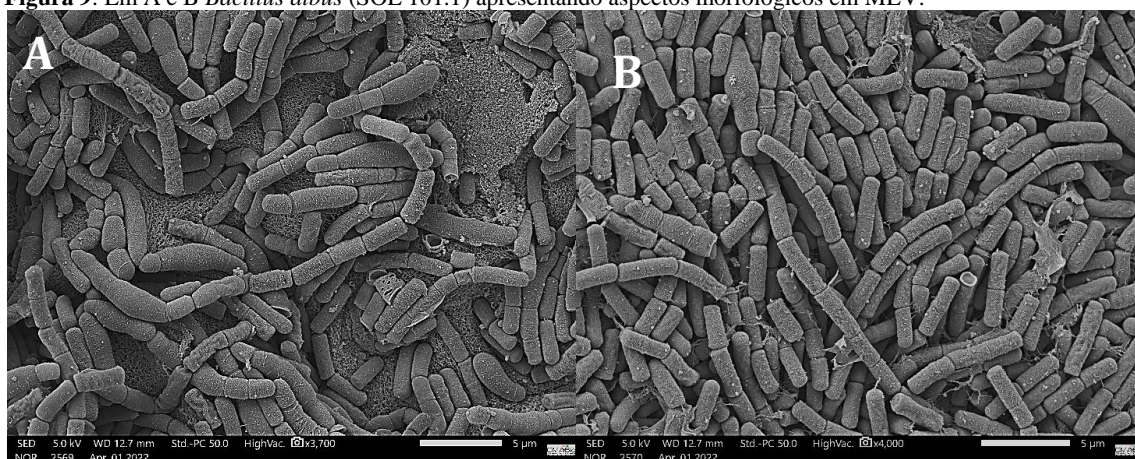


**Figura 8:** Em A e B *Bacillus cabrialesii* (SOL 112) apresentando aspectos morfológicos em MEV.



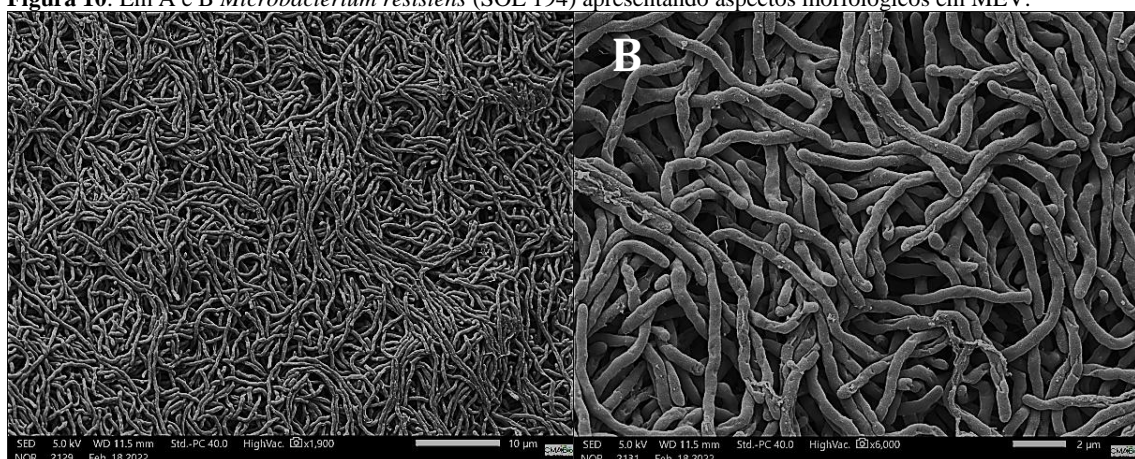
Fonte: Monteiro, 2022.

**Figura 9:** Em A e B *Bacillus albus* (SOL 101.1) apresentando aspectos morfológicos em MEV.



Fonte: Monteiro, 2022.

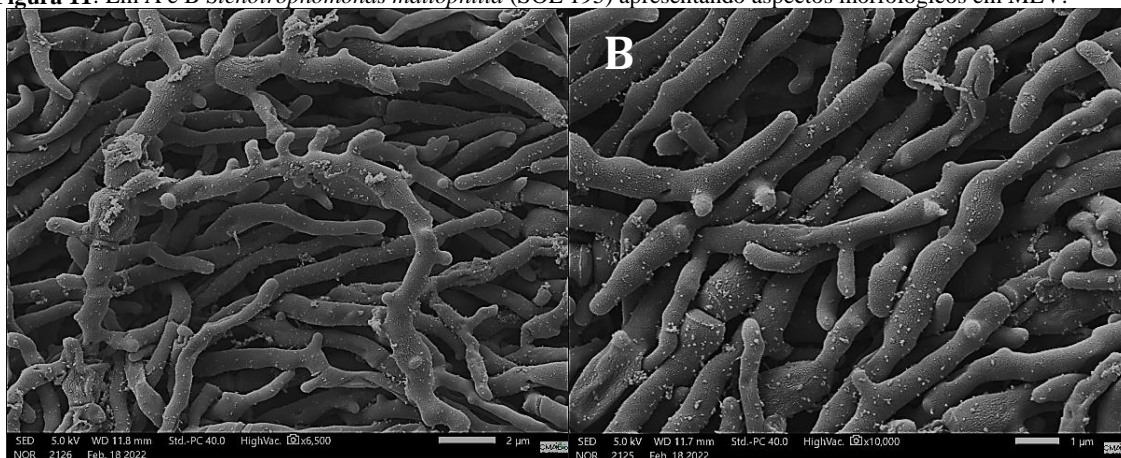
**Figura 10:** Em A e B *Microbacterium resistens* (SOL 194) apresentando aspectos morfológicos em MEV.



Fonte: Monteiro, 2022.

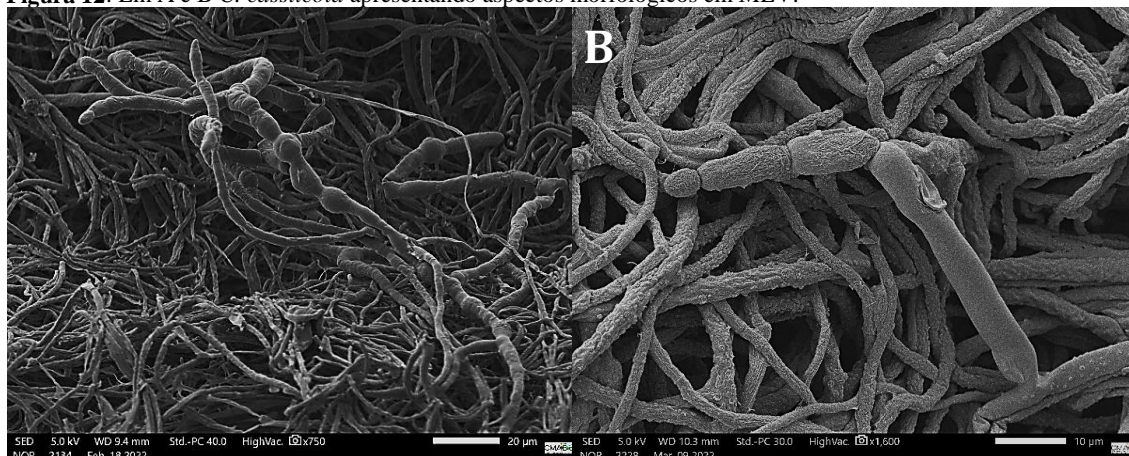


**Figura 11:** Em A e B *Stenotrophomonas maltophilia* (SOL 195) apresentando aspectos morfológicos em MEV.



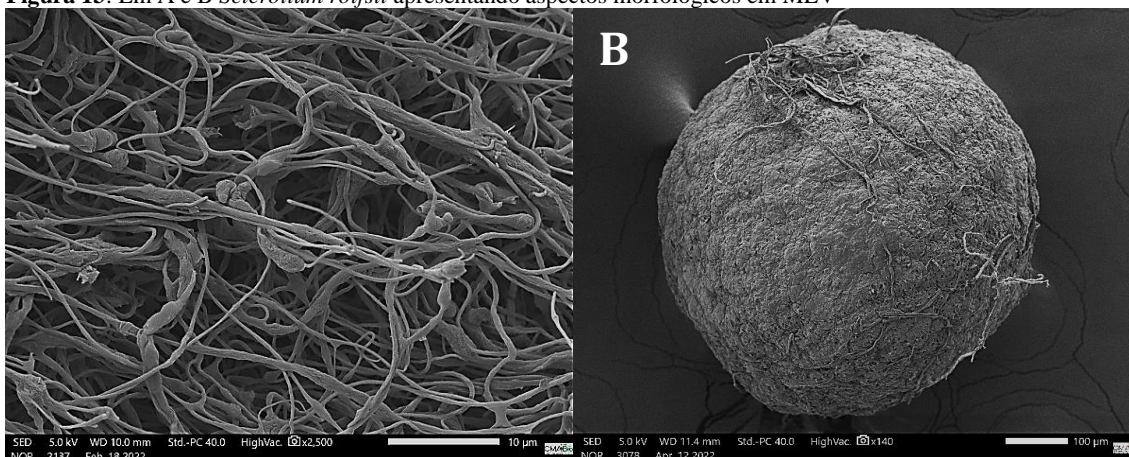
Fonte: Monteiro, 2022.

**Figura 12:** Em A e B *C. cassicola* apresentando aspectos morfológicos em MEV.



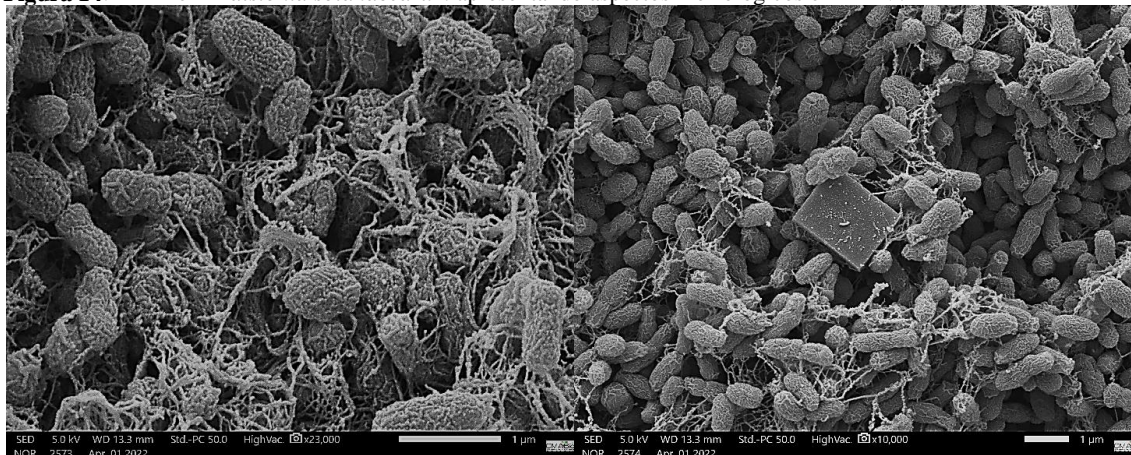
Fonte: Monteiro, 2022.

**Figura 13:** Em A e B *Sclerotium rolfsii* apresentando aspectos morfológicos em MEV



Fonte: Monteiro, 2022.

**Figura 14:** Em A e B *Ralstonia solanacearum* apresentando aspectos morfológicos em MEV.



Fonte: Monteiro, 2022.

### 5.3-Avaliação de bactérias antagonistas no controle de doenças de tomateiro

#### 5.3.1-Controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*)

Em relação ao controle da *R. solanacearum* todos os putativos biocontroles *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1), *Bacillus* sp. (SOL101.1) e *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) no período de análise de 35 dias indicaram controle total da doença sem distinção de notas, pois quando comparadas as unidades expostas somente ao patógeno, estas ao final dos 35 dias e em todos os três experimentos estavam estatisticamente com médias de 3.26 e finalizando os estudos com nota 4, o que representa a morte da planta, enquanto todas as plantas que receberam os biocontroles nos três experimentos não apresentaram sinais de murcha bacteriana (Tabela 7) e (Figura 15).

Aos 13 dias após a inoculação de todos os controles positivos, ou seja, dia 25 de setembro de 2022 começaram as manifestações da doença murcha bacteriana e já apresentando nota 2 de acordo com a escala diagramática de notas proposta por Gomes (1997) em todas as unidades experimentais dos controles positivos de todos os três experimentos, bem como no experimento 3 além de todos os controles positivos apresentando nota 2 haviam de forma aleatória dentro do experimento 18 unidades experimentais com sintomas da murcha bacteriana apresentando nota 1 e 12 plantas de forma aleatória também apresentando nota 2. Assim neste momento foram então inoculadas as putativas biocontroladoras. E já na terceira avaliação geral dos experimentos, ou seja, dia 27 de setembro de 2022, todas as 30 unidades experimentais não

pertencentes aos controles positivos do experimento 3 haviam se recuperado e não mais apresentando sintomas da murcha bacteriana em contrapartida todos os controles positivos de todos os três experimentos estavam com suas plantas já caracterizadas com nota 3 de acordo com a escala diagramática de notas proposta por Gomes (1997). Assim sendo, ocorreu de forma eficaz o efeito curativo em 30 unidades experimentais com a inoculação das bactérias putativas biocontroladoras.

**Tabela 7:** Médias de severidade da murcha bacteriana em tomateiro, causada por *Ralstonia solanacearum*, após 35 dias de avaliação de biocontrole bacteriano.

Tratamentos	Médias de Severidade		
	Efeito preventivo	Coinoculação	Efeito curativo
<b>Controle positivo</b>	3,26 a	3,26 a	3,26 a
<b>Controle negativo</b>	0,00 b	0,00 b	0,00 b
<b>Isolado SOL 195.1</b>	0,00 b	0,00 b	0,00 b
<b>Isolado Pc A1</b>	0,00 b	0,00 b	0,00 b
<b>Isolado SOL 1011</b>	0,00 b	0,00 b	0,00 b
<b>CV (%)</b>	109,18	109,18	109,18
<b>DMS</b>	0,96	0,96	0,96

Medidas de tratamentos seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

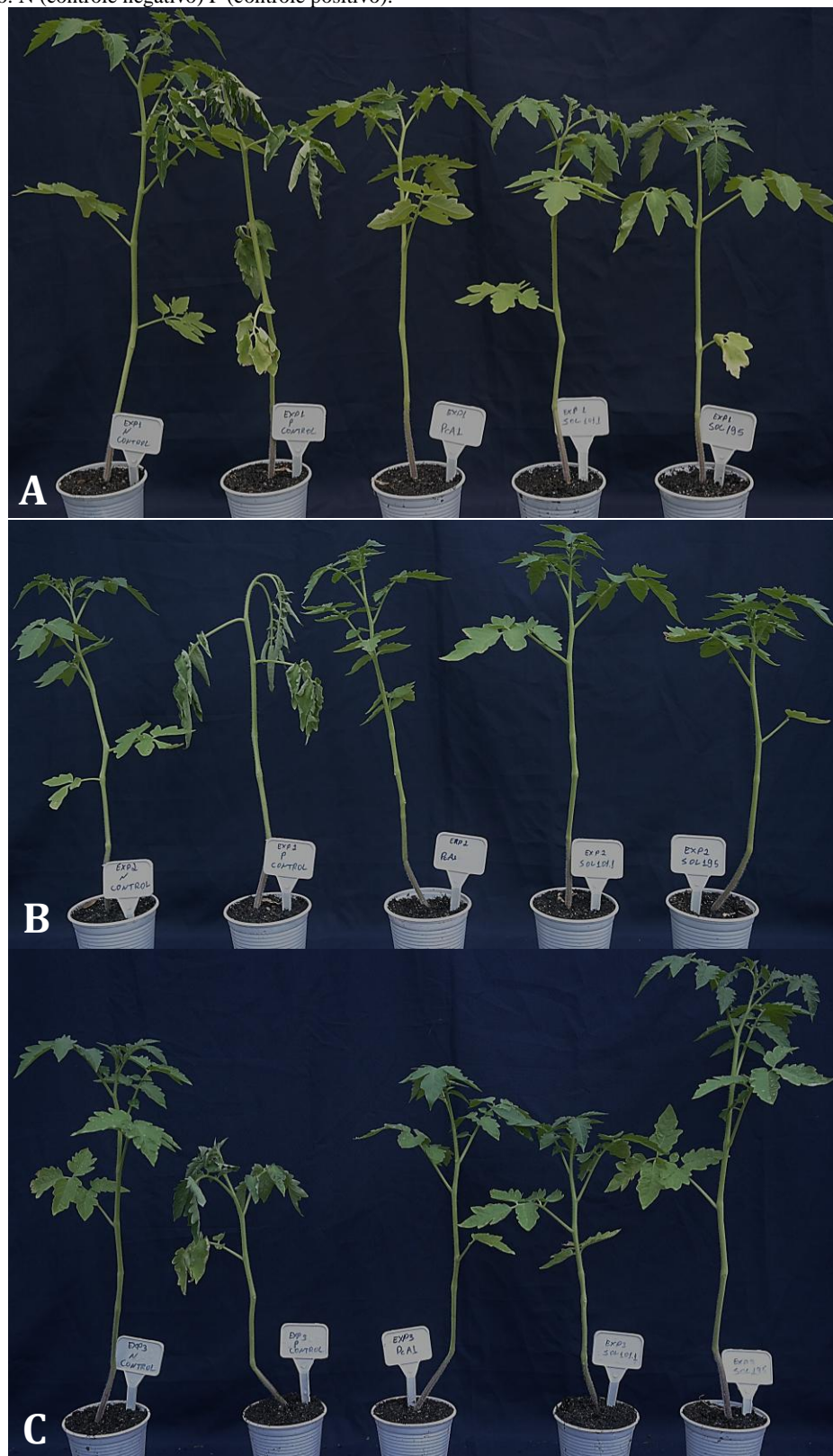


**Figura 15:** Avaliação do efeito antagonista de Pc A1 (*Bacillus amyloliquefaciens*), SOL 101.1 (*Bacillus* sp.) e SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.) em tomateiros 12 dias após germinação primeiro dia da inoculação do patógeno. Em A efeito preventivo, B co-inoculação e C efeito curativo. N (controle negativo) P (controle positivo).



Fonte: Monteiro, 2022.

**Figura 16:** Avaliação do efeito antagonista de Pc A1 (*Bacillus amyloliquefaciens*), SOL 101.1 (*Bacillus* sp.) e SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.) em tomateiros 15 dias após inoculação do patógeno. Em A efeito preventivo, B co-inoculação e C efeito curativo. N (controle negativo) P (controle positivo).



Fonte: Monteiro, 2022.



**Figura 17:** Avaliação do efeito antagonista de Pc A1 (*Bacillus amyloliquefaciens*), SOL 101.1 (*Bacillus* sp.) e SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.) em tomateiros 35 dia após inoculação do patógeno. Em A efeito preventivo, B co-inoculação e C efeito curativo. N (controle negativo) P (controle positivo).





Fonte: Monteiro, 2022.

Os resultados obtidos indicaram que tanto a *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) quanto *Bacillus* sp. (101.1) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1) foram eficientes no biocontrole de murcha bacteriana pois quando comparado aos trabalhos de Toyota *et al.* (2015) o *Bacillus amyloliquefaciens* inoculado em tomateiro aumentou em 67% a capacidade da planta sobreviver com a infecção da doença causada pela *R. solanacearum*. Sendo que na pesquisa destes autores a *Stenotrophomonas maltophilia* não apresentou nenhum resultado significativo quanto ao controle da doença murcha bacteriana. E neste presente estudo se mostrou tanto ter maior controle da bactéria nos testes *in vitro* quanto indicou ter o controle inclusive com efeito curativo da doença murcha bacteriana quando já apresentando sintomas no tomateiro.

Os testes realizados até o momento em casa de vegetação indicaram que esses isolados são promissores para testes em campo.



### 5.3.2-Controle da murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii*)

As avaliações contra *S. rolfsii* os resultados das plantas tratadas com as bactérias, com base na escala de nota de severidade da doença, obtiveram notas acima do controle positivo, indicando que não houve controle (Tabela 8) (Figura 6). No experimento por meio de coinoculação (patógeno e biocontrole inoculados concomitantemente) também não houve controle da doença, pois os tratamentos foram estatisticamente iguais ao controle positivo (Tabela 8 e Figura 18).

No efeito curativo (inoculação do biocontrole em plantas sintomáticas) as plantas tratadas com o *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1) e o *Bacillus* sp. (SOL 112) apresentaram nota de severidade da doença, significativamente menor que a do controle positivo (Tabela 8 e Figura 19).

**Tabela 8:** Médias de severidades de murcha de esclerócio causada por *Sclerotium rolfsii* em relação a três bactérias avaliadas em relação aos efeitos preventivo, coinoculação e efeito curativo.

	Médias de Severidade		
	Efeito preventivo	Coinoculação	Efeito curativo
<b>Controle negativo</b>	0,00 a	0,00 a	0,00 a
<b>Controle positivo</b>	2,97 b	2,40 b	2,79 c
<b>SOL 101.1</b>	3,06 b c	2,66 b	2,46 b c
<b>SOL 112</b>	3,09 b c	2,36 b	2,36 b
<b>Pc A1</b>	3,16 c	2,13 b	2,19 b
<b>CV (%)</b>	2,79	34,56	10,16
<b>DMS</b>	0,13	1,25	0,38

Medidas de tratamentos seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Figura 18:** Avaliação do efeito preventivo dos isolados: (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (C) *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1). (D) *Bacillus* sp. (SOL 101.1) e (E) *Bacillus* sp. (SOL 112) contra *S. rolfsii*.



Fonte: Monteiro, 2022.



**Figura 19:** Avaliação do efeito coinoculado dos isolados: (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (C) *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1). (D) *Bacillus* sp. (SOL 101.1) e (E) *Bacillus* sp. (SOL 112) contra *S.rolfsii*.



Fonte: Monteiro, 2022.



**Figura 20:** Avaliação do efeito curativo dos isolados: (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (C) *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1). (D) *Bacillus* sp. (SOL 101.1) e (E) *Bacillus* sp. (SOL 112) contra *S.rolfsii*.



Fonte: Monteiro, 2022.

### 5.3.3-Controle da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*)

No efeito preventivo tanto a *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) quanto o *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1) mantiveram as menores médias de severidade da doença mancha-

alvo com nota 2,6 de média, não havendo diferenças estatística entre elas. Seguido da *Microbacterium* sp. (SOL 194) com a maior média (3,40).

Quando avaliadas por meio de coinoculação a *Microbacterium* sp. (SOL 194) apresentou a menor média (2,6) mesmo sendo todas estatisticamente iguais. Na avaliação do efeito curativo o *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1) manteve a menor média de severidade da doença mancha-alvo (2,8) permanecendo sem distinção estatística a nível de 5% apenas para a *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) que ficou com 3.4 de média de severidade da doença mancha-alvo. Seguida da bactéria SOL 194 com nota 4 de média de severidade da doença mancha-alvo.

O isolado PcA1 manteve-se nos três testes realizados a menor média de severidade desta doença no tomateiro. Assim como tanto no efeito coinoculado quanto no efeito curativo não apresentou alteração no valor da nota em relação ao controle da ação fitopatogênica do fungo *C. cassiicola* ao tomateiro. E das três bactérias analisadas para o efeito curativo se mostrou a mais eficiente no controle do fungo *C. cassiicola* no tomateiro em casa de vegetação (Tabela 9) e (Figura 21).

Os resultados obtidos aqui corroboram com os estudos de Blanco *et al.* (2021) pois em seus testes mesmo combinados com nitrato de amônia o *B. amyloliquefaciens* não foi eficiente quanto a evitar a mortalidade dos tomateiros infectados com *S. rolfsii*.

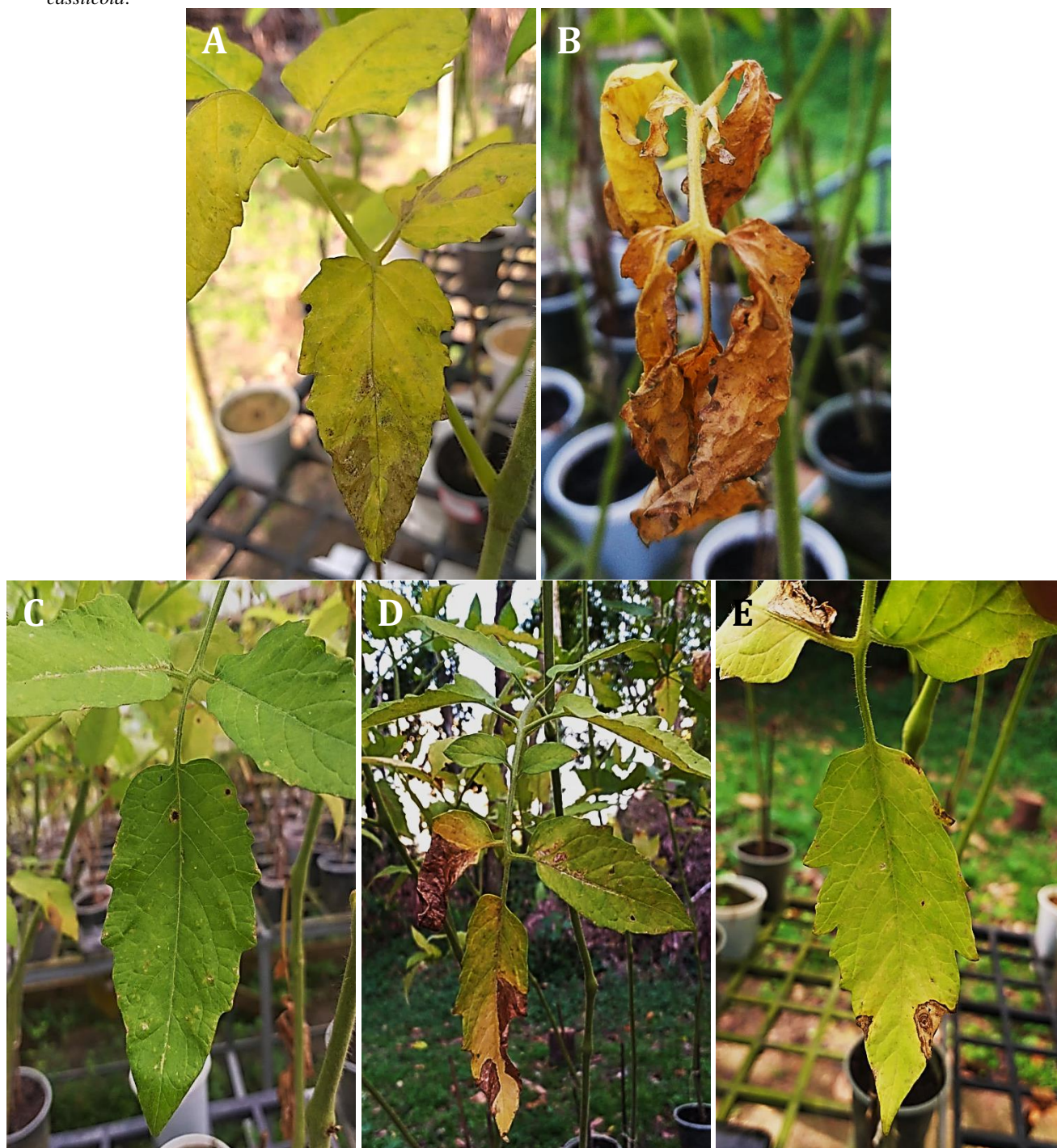
**Tabela 9:** Médias de severidades do fungo *Corynespora cassiicola* em relação a três bactérias utilizadas para avaliar os efeitos preventivo, coinoculado e curativo.

<i>C. cassiicola</i> x Biocontrole	Médias de Severidade		
	Efeito preventivo	Coinoculação	Efeito curativo
<b>SOL 195</b>	2,60 a	3,00 a	3,40 a b
<b>Pc A1</b>	2,60 a	2,80 a	2,80 a
<b>SOL 194</b>	3,40 a b	2,60 a	4,00 b c
<b>Controle negativo</b>	3,80 a b	4,80 b	4,80 c
<b>Controle positivo</b>	4,80 a b	5,00 b	4,60 c
<b>CV (%)</b>	29,93	16,02	16,13
<b>DMS</b>	1,94	1,10	1,19

Medidas de tratamentos seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



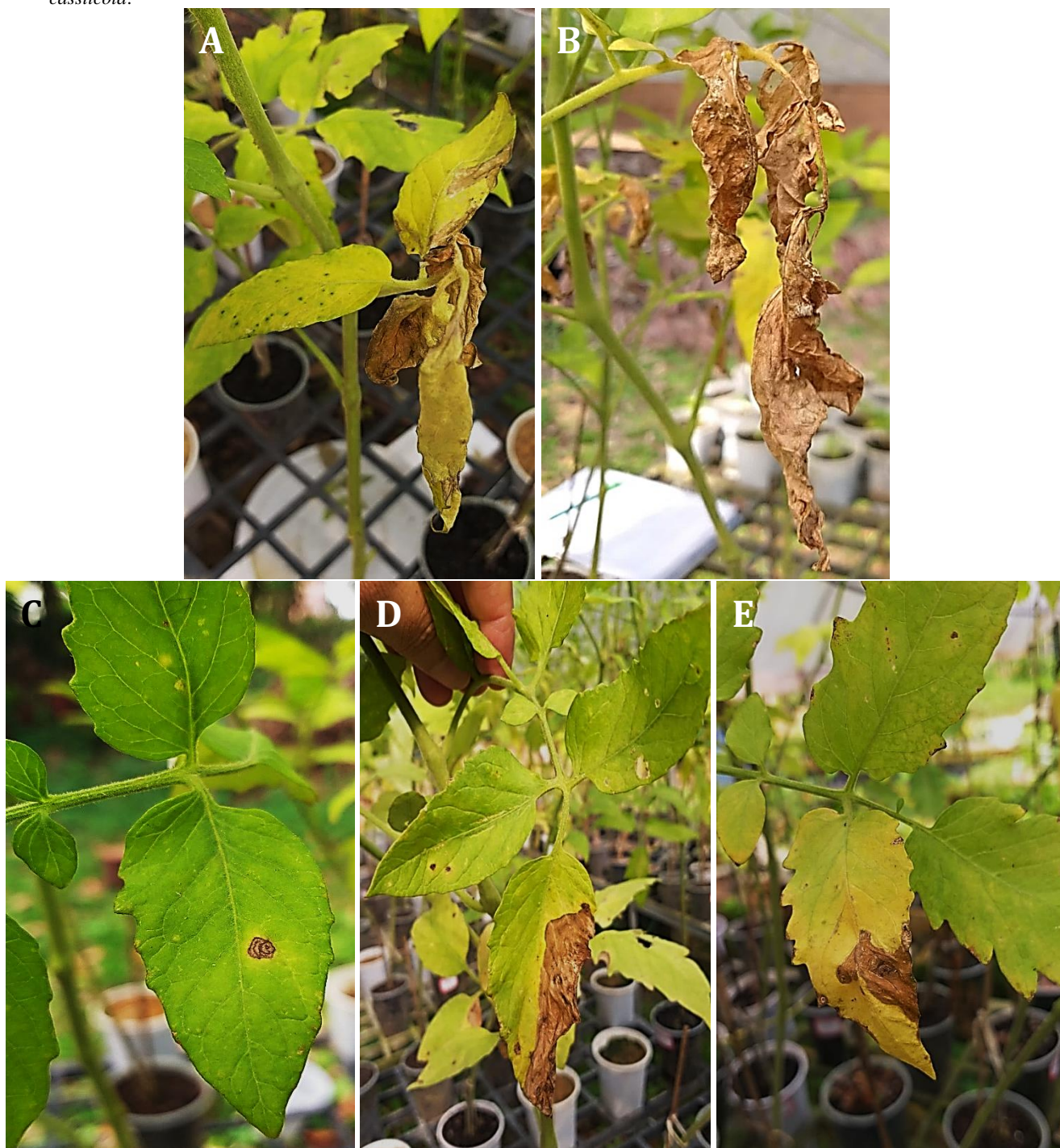
**Figura 21:** Avaliação do efeito preventivo dos isolados: (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (C) *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1). (D) *Microbacterium* sp. (SOL 194) e (E) *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) contra *Corynespora cassicola*.



Fonte: Monteiro, 2022.



**Figura 22:** Avaliação do efeito coinoculado dos isolados: (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (C) *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1). (D) *Microbacterium* sp. (SOL 194) e (E) *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) contra *Corynespora cassicola*.



Fonte: Monteiro, 2022.



**Figura 23:** Avaliação do efeito curativo dos isolados: (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (C) *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1). (D) *Microbacterium* sp. (SOL 194) e (E) *Stenotrophomonas* sp. (SOL 195) contra *Corynespora cassicola*.



Fonte: Monteiro, 2022.

Os resultados alcançados indicam que o *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1) foi o mais eficiente no biocontrole tanto do patógeno *R. solanacearum* quanto *C. cassicola*. Sendo



portanto uma bactéria com potencial para o desenvolvimento de um bioproduto para controle biológico.

Quando comparados os resultados obtidos tanto *in vitro* quanto *in planta*, os isolados testados apresentaram melhor desempenho do que alguns trabalhos reportados na literatura. López *et al.* (2021) *in vitro* avaliou dois isolados do gênero *Microbacterium* e dois isolados do gênero *Stenotrophomonas* reduziram 25% o crescimento de *C. cassiicola*. Neste trabalho *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1) apresentou 60,74% de inibição do crescimento de *C. cassiicola* nos testes de sete dias de antagonismo *in vitro*, sendo o que indicou a segunda posição de antagonista dentre as bactérias avaliadas neste período. Prosseguiu de forma progressiva assumindo o primeiro lugar quanto ao percentual de inibição deste fungo nas demais avaliações até aos 21 dias (70,20% e 75,73% respectivamente). Os resultados do percentual de inibição de *C. cassiicola* promovido pelo *Bacillus amyloliquefaciens* nesta presente pesquisa foram também superiores aos resultados alcançados com os trabalhos de Riddech *et al.* (2017) pois em seus estudos pelo método de cultura dupla realizado por sete dias o *B. amyloliquefaciens* apresentou somente 47,63% de inibição do fungo *C. cassiicola*.

O isolado Pc A1 (*B. amyloliquefaciens*) manteve a menor média de severidade da mancha-alvo quando comparados as demais bactérias avaliadas nos três experimentos e reduziu em 56% a severidade da doença mancha-alvo. Os resultados avaliados *in planta* na ação antagônica contra *C. cassiicola* além de ser superiores aos avaliados por Imran *et al.* (2022).

## 6- Conclusões

1- A avaliação *in vitro* indicou que o isolado SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.) obteve o maior percentual de inibição do crescimento de *R. solanacearum*, com 75,62%, bem como apresentando aumento progressivo da atividade antagonista no decorrer do experimento.

2- *In vitro* o isolado PcA1 (*B. amyloliquefaciens*) manteve o maior percentual de inibição de crescimento do fungo *S. rolfsii* variando de 78,18% (sete dias) a 67,40% (21 dias). Pc A1 também, manteve aumento progressivo de inibição do crescimento de *C. cassiicola* até o último dia de análise, com 75,73% de inibição aos 21 dias. Mostrando ser o mais eficiente nos testes antagônicos contra *C. cassiicola*.

3- As análises *in planta* revelaram que os isolados SOL 195 (*Stenotrophomonas* sp.) SOL 101.1 (*Bacillus* sp.) e Pc A1 (*B. amyloliquefaciens*) foram eficazes no controle da murcha bacteriana em tomateiro.

4- Os isolados PcA1 (*B. amyloliquefaciens*); SOL 101.1 (*Bacillus* sp.); SOL 112 (*Bacillus* sp.) não apresentaram nenhum efeito contra a murcha causada por *S. rolfsii*.

5- O isolado PcA1 também foi o mais eficiente contra *C. cassiicola* com consequente redução da severidade da mancha alvo.

## 7- Referências Bibliográficas

Adhilakshmi, M.; Latha, P.; Paranidharan, V.; Balachandar, D.; Ganesamurthy, K.; Velazhahan, R. 2014. Biological control of stem rot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. with actinomycetes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(3), 298-311.

Barbosa, R. N. T.; Halfeld-Vieira, B. A.; Nechet, K. L.; Souza, G. R. 2010. Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Roraima. *Revista Agro@mbiente On-line*, 4 (1): p. x-y. Boa Vista, Roraima.

Bastos, C.N. 1997. Efeito do óleo de Piper aduncum sobre *Crinipellis perniciosae* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 22, 441-443.

Beneduzi, A.; Moreira, F.; Costa, P. B.; Vargas, L. K.; Lisboa, B. B.; Favreto, R.; Baldani, J. I.; Passaglia, L. M. P. 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, (63), 94-104.

Blanco, N. H. M.; Barbosa, D. F. R.; Graichen, F. A. S. 2021. Antagonistic microorganisms and nitrogen fertilization in control of tomato southern blight. *Arquivos do Instituto Biológico*, 88.

Camargo, A. M. M. P. de; Camargo, F. P. de; Alves, H. S.; Camargo Filho, W. P. de. 2006. Desenvolvimento do sistema agroindustrial de tomate. *Informações Econômicas*, 36 (6), 53-65.

Campbell, R.; Greaves, M. P. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: Lynch J.M., (eds.) John Wiley e Sons, 11-34.

Carrer Filho, R.; Dianese, É. D.; Gomes da Cunha, M. 2015. Suppression of *Fusarium* wilt in tomato plants by rhizobacteria from the *Bacillus* genus. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45(3).

Carrijo, O. A.; de Souza, R. B.; Marouelli, W. A.; de Andrade, R. J. 2005. Fertirrigação de hortaliças. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.

Costa, I. B. 2012. Avaliação de rizobactérias de solo antrópico, na promoção de crescimento e na indução de resistência contra mancha-alvo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).

Coutinho, L. 2016. *Biomass brasileiros*. Oficina de Textos. São Paulo – SP.

Crane, J. M.; Gibson, D. M.; Vaughan, R. H.; Bergstrom, G. C. 2013. Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of Fusarium head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Phytopathology*, 103, 146-155. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0154-R>

Dahlke, I.; Guerra, D.; Souza, E. L.; Lanzasova, M. E.; Bohrer, R. E. G.; Ramires, M. F. 2019. Desempenho Produtivo do Tomateiro sob Cultivo Protegido Utilizando Caldas Agroecológicas. *Cultura Agrônômica. Revista de Ciências Agrônômicas*, 28 (2), 204-214. ISSN 2446-8355. <http://dx.doi.org/10.32929/2446-8355.2019v28n2p204-214>.

de Melo, T. A.; de Souza Serra, I. M. R. 2021. O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas. *Research, Society and Development*, 10(9), e18110917817-e 8110917817.

Donagema, G. K.; de Campos, D. B.; Calderano, S. B.; Teixeira, W. G.; Viana, J. H. 2011. Manual de métodos de análise de solo. *Embrapa Solos-Documents (INFOTECA-E)*.

Doyle, J. 1991. DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, Berlin, Heidelberg, 283-293.

Duma, M.; Alsina, I.; Dubova, L.; rdberga, I. 2015. Chemical composition of tomatoes depending on the stage of ripening. *Chemical Technology*, 66(1), 24-28.

Elhalag, K. M.; Messiha, N. A. S.; Emara, H. M.; Abdallah, S. A. 2016. Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions. *Journal of Applied microbiology*, 120(6), 1629-1645.

Ferreira, D. F. 2019. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar. *Brazilian Journal of Biometrics*, 37(4), 529-535.

Fisch, G.; Marengo, J. A.; Nobre, C. A. 1998. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. *Acta amazônica*, 28(2), 101-101.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION - FAO. 2019. FAO Statistical Yearbook. New York. Disponível em: <http://www.fao.org/statistics/en/>. Acessado em: 02/01/2022.

Gomes, A. M. A. 1997. Identificacao de progenies de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) industrial resistentes a *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., e progresso da murcha bacterina.

Hermosa, M.R.; Grondona, I.; Iturriaga, E.A.; Diaz-Minguez, J.M.; Castro, C.; Monte, E.; Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 66, (5), 1890-1898.

Ichikawa. T.; Ishikura, T.; Ozaki. A. 1971. Improvement of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiologica*, Tchechoslovaquia, 16, 218-224.

Imran, M.; Abo-Elyousr, K. A.; Mousa, M. A.; Saad, M. M. 2022. A study on the synergetic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and dipotassium phosphate on *Alternaria solani* causing early blight disease of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 162(1), 63-77.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2021. *Indicadores IBGE*. Estatística mensal da Produção Agrícola Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Brasília, Distrito Federal, 81.

Kuklinsky- Sobral, J.; Araújo, W. L.; Mendes, R.; Geraldi, I. O.; Pizzirani- Kleiner, A. A.; Azevedo, J. L. 2004. Isolation and characterization of soybean- associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental microbiology*, 6(12), 1244-1251.

Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

Kumari, P.; Bishnoi, S. K.; Chandra, S. 2021. Assessment of antibiosis potential of *Bacillus* sp. against the soil-borne fungal pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-11.

Kuramae, E. E.; Souza, N. L. 2002. Variabilidade genética entre formas especiais de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. *Acta Scientiarum*, Maringá, 24 (5), 1481-1485.

Lanna Filho, R.; Ferro, H. M.; de Pinho, R. S. C. 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, 4(2).

Lechevalier, H. A.; Lechevalier, M. P. 1967. Biology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 21(1), 71-100.

Leelasuphakul, W.; Hemmanee, P.; Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 48 (1), 113-121.

Lemessa F.; Zeller W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42, 336-344.

Lima, H. E.; do Rego, E. R.; Cavalcante, G. P.; do Rego, M. M.; Cota, L. V. 2010. Bacterial wilt resistance in tomato cultivars in Roraima, Brazil. *Horticultura Brasileira*, 28(2), 227-230.

Lopes, C. A. 2009. Murcha bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes. *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Lopes, C. A.; Boiteux, L. S.; Eschemback, V. 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. *Horticultura Brasileira*, 33(01).

Lopes, C. A.; Rossato, M. 2013. Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

López, S. M.; Pastorino, G. N.; Balatti, P. A. 2021. Volatile organic compounds profile synthesized and released by endophytes of tomato (*Solanum lycopersici* L.) and their antagonistic role. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1383-1397.

MacKenzie, K. J.; Sumabat, L. G.; Xavier, K. V.; Vallad, G. E. (2018). A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. *Plant Health Progress*, 19(4), 303-309.

Makishima, N.; Carrijo, O. A. 1998. Cultivo protegido do tomateiro. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica 13 (INFOTECA-E)*.

Messiha N.; Van Diepeningen A.; Farag N.; Abdallah S.; Janse J.; Van Bruggen A. 2007. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *European Journal of Plant Pathology* 118, 211-225.

Moraes, T. B. 2017. Eficiência de doses de nitrogênio e sombreamento na cultura do tomate em cultivo protegido. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Moura A. B.; Romeiro RS. 1999. Avaliação "in vitro" de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). *Ciência e Agrotecnologia* 23, 281-288.

Nguyen, M. T.; Ranamukhaarachchi, S. L. 2010. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology*, 395-405.

Oliveira, A. P. G.; Sabino, S. M.; GANDINE, S. M.; MOULIN, T.; AMARAL, A. A. D. 2014. Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. *Enciclopédia Biosfera*, (18), 3938-3952.

Oliveira, M. F.; da Silva; M. G.; Van Der Sand, S. T. 2010. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18 (6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology*, 161(7), 565-572.

Olmos, E.; Mehmood, N.; Husein, L. H.; Goergen, J. L.; Fick, M.; Delaunay, S. 2013. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(3), 259-272.

Patil, Hemant J. et al. 2011. Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop protection*, 30, (10), 1269-1273.

Pernezny, K.; Simone, G. W. 1999. Target spot of several vegetable crops. *Plant Pathology Fact Sheet*, 39-44.

Quezado-Duval, A. M.; Inoue-Nagata, A. K.; Reis, A.; Pinheiro, J. B.; Lopes, C. A.; Araújo, E. R.; Becker, W. F. 2013. Levantamento de doenças e mosca-branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil. *Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.

Riddech, N.; Sritongon, K.; Phibunwatthanawong, T. 2017. Production of plant growth promoting antagonistic Rhizobacteria to promote cucumber growth and control leaf spot disease (*Corynespora cassiicola*). *Chiang Mai Journal of Sciences*, 44(1), 72-82.

Rocha, D. J. A.; Moura, A. B. 2013. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology*, 38(5), 423-430.

Rodrigues, F.; Nunes, A. C. P.; Carvalho, D. D. C.; Ribeiro, M. C. 2018. Indução de tolerância à murcha bacteriana em híbridos de tomates por aplicação de giberelina. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 17(1), 54-60.

Sahilah, A. M.; Tang, S. Y.; Zaimawati, M. N.; Rosnah, H.; Kalsum, M. U.; Son, R. 2010. Identification and characterization of actinomycetes for biological control of bacterial wilt of *Ralstonia solanacearum* isolated from tomato. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc*, 38(1), 103-114.

Semêdo, L. T. A. S. 1997. *Atividade antimicrobiana e celulolítica de actinomicetos isolados de solos brasileiros* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ).

Takahashi, Y. 2017. Genus *Kitasatospora*, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. *The Journal of antibiotics*, 70(5), 506-513. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.8>.

Tamreihao, K.; Ningthoujam, D. S.; Nimaichand, S.; Singh, E. S.; Reena, P.; Singh, S. H.; Nongthomba, U. 2016. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological research*, 192, 260-270.

Tamura, K.; Stecher, G.; and Kumar, S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. Acesso em <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Teramoto, A.; Parisi, M.; e Cunha, M. G. 2013. Caracterização fisiológica de isolados de *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology*, 38(4), 313-322.

Thampi, A.; Bhai, R. S. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control*, 109, 1-13.

Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673–4680.

Toyota, K.; Yokota, K. 2015. Characterization of possible bacterial biocontrol agents, isolated from various plants in Indonesia, against bacterial wilt and damping-off of tomato. *Soil Microorganisms*, 69(1), 39-47.

Vale, F. D.; Junior, W. D. J.; Liberato, J. R.; e Souza, C. A. 2004. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*, 1.

Velho-Pereira, S.; Kamat, N. M. 2011. Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified “Cross-Streak” method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73, 223-228.

Vergnes, S.; Gayraud, D.; Veyssi re, M.; Toulotte, J.; Martinez, Y.; Dumont, V.; e Dumas, B. 2020. Phyllosphere Colonization by a Soil Streptomyces sp. Promotes Plant Defense Responses Against Fungal Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(2), 223-234.

Voss, G. B. 2013. Produção de *Bacillus subtilis* em biorreator airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. J. W. T.; e Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Xue Q. Y.; Chen Y.; Li S. M.; Chen L. F.; Ding G. C.; Guo D. W.; Guo J. H. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48, 252-258.

Yamunarani, K., Sundaram, A. K., & Pandiyan, M. 2019. Streptomycetes as a potential biocontrol agent. *J. Entomol. Zool. Stud*, 7, 637-644.