



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Determinação de doses subinibitórias de cobre em
Xanthomonas euvesicatoria pv. *perforans* e *Bacillus* spp. e sua
ação na severidade da mancha bacteriana do tomateiro**

ERIVALDO LAURENTINO DA SILVA

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

2024

ERIVALDO LAURENTINO DA SILVA

Determinação de doses subinibitórias de cobre em *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* e *Bacillus spp.* e sua ação na severidade da mancha bacteriana do tomateiro

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientadora

Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira

Coorientadora:

Alice Maria Quezado-Duval

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Silva, EL.

Determinação de doses subinibitórias de cobre em *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* e *Bacillus* spp. e sua ação na severidade da mancha bacteriana do tomateiro

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Erivaldo Laurentino da Silva

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Determinação de doses subinibitórias de cobre em *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* e *Bacillus* spp. e sua ação na severidade da mancha bacteriana do tomateiro

GRAU: DOUTOR ANO: 2024

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Ao autor reservam-se os direitos de publicação e nenhuma parte desta tese pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Erivaldo Laurentino da Silva
CPF: 096.275.934-19

A Deus, à minha esposa Marciane e aos meus pais e familiares,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de fazer meu Doutorado em uma das maiores e melhores universidades do Brasil.

À minha esposa Marciane da Silva Xavier Laurentino, por estar sempre comigo me apoiando, especialmente nos momentos mais difíceis por me incentivar a seguir ante as dificuldades e tornando a tarefa mais leve e feliz.

A meus familiares: Antônio (pai) e Inês (mãe), minha irmã Josefa Edivânia e Manoel e José Laurentino (irmãos), Lenilson Félix, Nicollas e Samuel meus sobrinhos, madrinha Zefa e todas minhas tias, por sempre torcerem por mim, ajudando sempre que possível e necessário.

A meus amigos Izaías e Ian pelas horas dedicadas a amizade e cafés de onde surgiram ideias, soluções para problemas, histórias e muito riso. O apoio e amizade singulares e especiais para mim foram essenciais nessa jornada.

A Ricardo que muito ajudou na confecção de gráficos e a toda equipe do Lab Bac: Alice, Angelica, Lucielen, Julieth, Shara, Henrique, Augusto e Viviane pelo apoio.

Ao professor Maurício Rossato pela prestatividade inúmeras vezes fazendo muito por mim e ajudando sem nunca se negar.

A Embrapa pelo apoio estrutural cedido, em especial a Eduardo, Sr.º Reinaldo e Luana (técnicos) e à minha coorientadora Dr.^a Alice Quezado, pelo apoio e ensinamentos durante todo o trabalho.

Ao PGFIT e de modo especial a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Marisa Ferreira pela paciência e orientação durante o desenrolar de toda a tese, sempre estando disponível quando necessitei.

A todos, agradeço.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marisa Alvares da S. Velloso Ferreira, e coorientação da Dr.^a Alice Maria Quezado-Duval, com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Hortaliças) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF.

**DETERMINAÇÃO DE DOSES SUBINIBITÓRIAS DE COBRE EM
XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. *PERFORANS* E *BACILLUS SPP.* E SUA
AÇÃO NA SEVERIDADE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

ERIVALDO LAURENTINO DA SILVA

Tese aprovada em _28_/_09_/_2024_ por:

Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale (UnB)
(Examinador interno)

Dr. Edivânio Rodrigues de Araújo (Epagri)
(Examinador externo)

Profª. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)
(Examinadora externo)

Profª. Dra. Thais Ribeiro Santiago (UnB)
(Suplente)

Profª. Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira (UnB)
Orientadora (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2024

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO GERAL	15
GENERAL ABSTRACT	18
CAPÍTULO 1.....	20
Revisão bibliográfica.....	20
A importância das fitobacterioses	21
Controle das fitobacterioses.....	22
Controle Químico	22
Controle Biológico	26
Efeito hormese na agricultura e usos potenciais	28
Efeito hormese na Fitopatologia.....	31
O gênero <i>Xanthomonas</i>	33
A mancha bacteriana (Mab) do tomateiro	36
A cultura do tomateiro e sua importância.....	36
Etiologia.....	36
Sintomatologia	38
Epidemiologia e manejo	39
Justificativa	41
Objetivo geral.....	42

Objetivos específicos	42
Referências	42
CAPÍTULO 2	58
Copper resistance and hormetic-like response in <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	58
Abstract	59
Introduction	60
Materials and methods	63
Bacterial isolates	63
Amplification of the <i>copA</i> gene by PCR	63
Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of copper on bacterial growth	64
Effect of subinhibitory doses of copper on the growth of <i>Xep</i>	65
Effects of copper preconditioning on bacterial growth and induction of resistance in <i>Xep</i>	66
Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on <i>Xep</i> biofilm formation	67
Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on bacterial spot severity in tomato plants	68
Results	69
Amplification of the <i>copA</i> gene by PCR	69
Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of copper for <i>Xep</i>	69

Effect of subinhibitory doses of copper on the bacterial growth of <i>Xep</i>	70
Effects of copper preconditioning on bacterial growth and induction of resistance in <i>Xep</i>	74
Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on <i>Xep</i> biofilm formation	80
Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on bacterial spot severity in tomato plants	83
Discussion	84
References	88
Conflict of Interest	98
Author Contributions	98
Funding	99
Acknowledgments	99
Data Availability Statement	99
CAPÍTULO 3	108
Resposta de <i>Bacillus</i> spp. a doses de cobre e efeitos da interação sobre o controle da mancha bacteriana do tomateiro (<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>)	108
Resumo	109
Abstract	111
Introdução	112
Materiais e métodos	114
Obtenção de isolados	114

Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de cobre sobre	
<i>Bacillus</i> spp.	115
Efeitos de doses subinibitórias no crescimento de <i>Bacillus</i> spp.	116
Comparação da eficiência do controle biológico (CB) da mancha bacteriana	
(Mab) por <i>Bacillus subtilis</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> isoladamente e em combinação	
com cobre	117
Otimização do controle biológico da Mab pelo uso da subdose estimulatória de	
cobre à <i>Bacillus subtilis</i> e eficiência da aplicação via “soil drench”	119
Resultados	120
Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do cobre sobre	
<i>Bacillus</i> spp.	120
Efeitos de doses subinibitórias no crescimento de <i>Bacillus</i> spp. em meio	
MMCC líquido.....	121
Comparação da eficiência do controle biológico (CB) por <i>Bacillus subtilis</i> e <i>B.</i>	
<i>amyloliquefaciens</i> sobre a mancha bacteriana (Mab)	125
Otimização do controle biológico da mancha bacteriana do tomateiro pelo uso	
de subdoses estimulatórias de cobre à <i>Bacillus subtilis</i> e eficiência da aplicação	
via “soil drench”	127
Discussão	129
Referências	132
CONCLUSÕES GERAIS	139
PERSPECTIVAS	140

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Revisão bibliográfica

Figura 1: Sintomas da Mancha bacteriana do tomateiro em mudas (A) e folhas de tomateiro (B, C). Setas brancas indicam áreas lesionadas.

Capítulo 2: Copper resistance and hormetic-like response in *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Figure 1 *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* isolate EH 2020-12 (S) 48 hour-growth curve in liquid MMCC amended with copper at two subinhibitory concentrations: Positive control: bacterial growth on MMCC without copper, Negative control: MMCC only.

Figure 2 *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* isolate EH 2017-27 (R) 48h-growth curve in liquid MMCC amended with subinhibitory copper of concentrations. Positive control: bacterial growth on MMCC without copper; Negative control: MMCC only.

Figure 3 Determination of the minimum inhibitory concentration of copper hydroxide (source: copper hydroxide) in solid MMCC (*medium minimum complexing copper*), before (MIC 1) and after preconditioning (MIC 2) with copper ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) for three isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. R= resistant, S= sensitive. For EH 2017-69 growth was observed at all concentrations tested after preconditioning up to $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, thus MIC 2 is higher than this concentration, being classified as phenotypically resistant in this study.

Figure 4 Determination of the minimum inhibitory concentration by applying different concentrations of copper hydroxide (copper in metallic equivalent $\mu\text{g mL}^{-1}$) directly

applied as drops onto MMCC medium containing isolate EH 2020-12 (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* *copA*⁻, S). P: isolate preconditioned to copper at 20 µg mL⁻¹/24h, NP: non-preconditioned isolate (control), White arrows: indicate translucent region with absence of bacterial growth (inhibitory halo), Dark arrows: indicate opaque region showing reduction of bacterial density at the copper deposition site, but without formation of a perfect inhibitory halo.

Capítulo 3: Resposta de *Bacillus* spp. a doses de cobre e efeitos da associação sobre o controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*)

Figura 1 Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* (expressa em OD₆₀₀/h) após 24 horas de exposição ao hidróxido - HC (A) à 20,0 µg mL⁻¹ e sulfato de cobre – SC (B) à 2,3 µg mL⁻¹ difusos em meio MMCC líquido.

Figura 2 Curva de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* (expressa em OD₆₀₀/h) após 24 horas de exposição ao hidróxido - HC (A) à 1,5 µg mL⁻¹ e sulfato de cobre – SC (B) à 0,28 e 9,3 µg mL⁻¹ difusos em meio MMCC líquido.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Copper resistance and hormetic-like response in *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Table 1 Growth stimulation in copper-sensitive *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (89-P) and *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (EH 2020-12) under different doses of copper (source: copper hydroxide), determined by the values of the Area Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) after 48 hours of exposure in liquid MMCC.

Table 2 Growth stimulation in copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (96-P) and *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (EH 2017-27) under different doses of copper (source: copper hydroxide), determined by the values of the Area Under the Bacterial Growth Curve (AUGC) after 48 hours of exposure in liquid MMCC.

Table 3 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the isolate EH 2020-12 (S) (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) preconditioned (P) and non-preconditioned (NP) with copper (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and exposed to different subinhibitory doses of the agent afterwards.

Table 4 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the isolate EH 2017-27 (R) (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) preconditioned (P) and non-preconditioned (NP) with copper (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and after exposed to different subinhibitory doses of the agent in one independent experiment involving P and NP.

Table 5 Influence of different doses of copper hydroxide added to liquid MMCC on biofilm formation (BF) of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, isolate EH 2017-27 (R) after 48 hours in two independent experiments.

Table 6 Influence of different doses of copper hydroxide added to liquid MMCC on biofilm formation (BF) of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, isolate EH 2020-12 (S) after 48 hours in two independent experiments.

Table 7 Influence of copper hydroxide) on the severity of Bacterial Spot caused by copper- sensitive (EH 2020-12) and resistant (EH 2017-27) isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) at five days after inoculation.

Capítulo 3: Resposta de *Bacillus* spp. a doses de cobre e efeitos da associação sobre o controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*)

Tabela 1 Inibição do crescimento bacteriano (cm) de *Bacillus subtilis* QST 713 - *BS* (Serenade®) e *B. amyloliquefaciens* MBI600 - *BA* (Duravel®), expostos a diferentes concentrações de sulfato (SC) ou hidróxido (HC) de cobre (em µg/mL) aplicado em gota diretamente sobre meio MMCC.

Tabela 2 Índice de severidade da mancha bacteriana do tomateiro (Mab) em resposta ao controle biológico por *Bacillus* spp. combinados ou não ao controle químico ou espalhante adesivo (EAS).

Tabela 3 Índice de severidade (ISEV) da mancha bacteriana do tomateiro (Mab) em função de diferentes agentes de controle e influência da dose hormética no controle exercido por *Bacillus subtilis* aplicados via foliar em dois experimentos.

Tabela 4 Índice de severidade (ISEV) da Mab em função de diferentes agentes de controle e influência da dose hormética (DH) no controle biológico exercido por *Bacillus subtilis* aplicados via Drench em dois experimentos.

RESUMO GERAL

Silva, Erivaldo Laurentino. **Determinação de doses subinibitórias de cobre em *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* e *Bacillus* spp. e sua ação na severidade da mancha bacteriana do tomateiro.** 2024. 140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Bactérias fitopatogênicas são capazes de causar sérios prejuízos em diversas culturas de importância econômica mundialmente, dentre elas, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*). O cultivo do tomate ocupa extensa área no Brasil, com 51.452 hectares plantados e uma produção estimada em 3,9 milhões de toneladas no ano de 2023, tornando o país o oitavo maior produtor mundial. A Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno (RIDE-DF) que engloba áreas do Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais, contribui com 10,78% da produção nacional do fruto em uma área de 4.774 hectares, com cerca de 74,28% da produção destinada à indústria. Dentre as fitobacterioses que afetam a cultura, a mancha bacteriana do tomateiro (Mab) causada por três espécies de *Xanthomonas*, dentre elas *X. euvesicatoria* pv. *perforans* – *Xep*, é uma das doenças foliares mais importantes. Seu manejo é realizado de modo integrado, utilizando o controle químico com bactericidas a base de cobre, e o biológico. Porém, para o controle químico é preocupante a possibilidade da redução de sua eficiência em função da emergência de populações resistentes aos produtos, incluindo os de ação multissítio. Esses efeitos indesejados podem estar relacionados a um fenômeno conhecido como efeito hormese. Este efeito é caracterizado por inibição e estímulo de alguma característica do organismo, pela exposição a altas e baixas concentrações, respectivamente, de um agente tóxico. Deste modo, doses subinibitórias para os

patógenos poderiam conduzir a estímulos com aumentos quantificáveis na severidade e incidência de doenças. Os impactos potenciais desse efeito ainda são pouco conhecidos e explorados na fitopatologia, mas estudos recentes têm demonstrado o seu potencial para aplicação comercial na agricultura. Uma dessas aplicações seria no aprimoramento do controle biológico de doenças. Espécies de *Bacillus* são agentes de biocontrole amplamente utilizadas em formulações comerciais por possuir boa habilidade de manutenção nos agroecossistemas. Cinco diferentes produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. são registrados para a cultura do tomateiro, dentre eles: Serenade (*B. subtilis* QST 713) e Duravel (*Bacillus amyloliquefaciens* MBI600). Neste estudo, investigou-se a resistência ao cobre em 45 isolados de *Xep*, espécie predominante no DF e entorno, o efeito hormese por doses subinibitórias de cobre sobre o crescimento e formação de biofilme, efeitos do condicionamento em subdose e de subdoses na virulência do patógeno, bem como na otimização do controle biológico da Mab do tomateiro com dois isolados comerciais de *Bacillus* spp. Verificou-se, via PCR, a presença do gene *copA* em 28,8 % dos isolados avaliados, levando à expressão fenotípica da resistência ao cobre na maioria dos casos. Um efeito estimulatório ou tipo-hormese por doses subinibitórias de cobre foi detectado em *Xep*, mas sem especificidade em relação ao isolado, ou presença do gene *copA*. Tais doses levaram a aumentos significativos no crescimento e produção de biofilme bacteriano comparados aos controles, mas efeito significativo no aumento da virulência, traduzido por maior severidade dos sintomas em tomateiros inoculados, não foi detectado em ensaios em casa de vegetação. *Bacillus* spp. não apresentaram compatibilidade com o cobre *in vitro* em doses acima da CMI, enquanto doses abaixo da CMI induziram resposta estimulatória com crescimento bacteriano superior ao controle. Aplicações de *Bacillus* spp. no controle biológico da Mab não reduziram a severidade da

doença em aplicações via foliar ou via “drench” e o cobre estimulatório *in vitro* a *Bacillus subtilis*, não apresentou efeito aditivo no controle da doença.

Palavras-chave: Controle químico; Controle biológico; Efeito estimulatório; *Solanum lycopersicum*; Subdose.

GENERAL ABSTRACT

Phytopathogenic bacteria can cause severe damage to various economically important crops worldwide, including tomato (*Solanum lycopersicum*). Tomato crop occupies 51,452 hectares in Brazil, with an estimated production of 3.9 million tons of tomatoes in 2023, placing the country as the eighth largest producer globally. The integrated region for the development of the Federal District and adjacent regions (RIDE-DF), which encompasses areas of the Federal District, Goiás, and Minas Gerais states, accounts for 10.78% of the national tomato production, covering an area of 4,774 hectares, with approximately 74.28% of the production destined for the industry. Among the phytopathogenic diseases affecting the tomato crop, bacterial spot (BS) caused by three species of *Xanthomonas*, including *X. euvesicatoria* pv. *perforans* – *Xep*, is one of the most important foliar diseases in the crop. Disease management can be achieved utilizing different control measures such as chemical, with copper-based bactericides, and biocontrol agents. However, there is a concern regarding the potential reduction in the effectiveness of chemical control due to the emergence of resistant bacterial populations, including those with multisite action. These undesired effects may be related to a phenomenon known as hormesis. This effect is characterized by the inhibition and stimulation upon exposure to high and low concentrations, respectively, of a toxic agent. Thus, subinhibitory doses for pathogens may lead to stimuli resulting in increases in severity and incidence of diseases. The potential impacts of this effect are still poorly understood and explored in phytopathology, but recent studies have demonstrated its potential for commercial application in agriculture. One such application would be in enhancing the biological control of diseases. *Bacillus* species are widely used as biocontrol agents in commercial formulations due to their ability to persist in

agroecosystems. Five different *Bacillus* commercial products are registered in Brazil for tomato, including Serenade (*B. subtilis* QST 713) and Duravel (*Bacillus amyloliquefaciens* MBI600). Thus, this study aimed to investigate the occurrence of copper-resistant isolates in a population of 45 *Xep* isolates, the predominant species in Federal District and adjacent regions, as well as the occurrence of the hormesis effect with the use of subinhibitory doses of copper. We examined its effects on *in vitro* bacterial growth and biofilm formation, the effects on resistance after preconditioning with sub-doses, the effects of sub-doses on pathogen virulence, and the optimization of biological control of BS on tomatoes using two commercial isolates of *Bacillus* spp. We detected the *copA* gene by PCR in 28.8% of *Xep* isolates and its expression led to *in vitro* copper resistance in most cases. A stimulatory effect, or hormesis-like response, by subinhibitory doses of copper was observed in *Xep*, but it was not isolate-specific nor related to the presence of the resistance gene. These doses induced significant increases in bacterial growth and biofilm production but did not affect *Xep* virulence in tomato plants evaluated by disease severity in green-house assays. *Bacillus* spp. did not exhibit *in vitro* compatibility with copper at doses above the minimum inhibitory concentration (MIC), while doses below the MIC induced a stimulatory response by increasing bacterial growth. Applications of *Bacillus* spp. for the biological control of bacterial spot did not reduce disease severity in foliar or drench applications, and the growth stimulation by copper sub-doses in *Bacillus subtilis* did not have an additive effect on disease control.

Keywords: Chemical control; Biological control; Stimulatory effect; *Solanum lycopersicum*; Subdose.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

A importância das fitobacterioses

Bactérias (Domínio Bacteria) são microrganismos procariotos, unicelulares, mas capazes de formar agregados estáveis conhecidos como biofilmes. Na interação com plantas, estes organismos podem estabelecer relações benéficas ou patogênicas (Vidaver e Lambrecht 2004).

Comparativamente aos fungos, as fitobactérias constituem um grupo menor como patógenos de importância da agricultura (Amorim et al. 2018), porém, as fitobacterioses podem causar sérios prejuízos em todo o mundo, sobretudo em países como o Brasil, onde o clima, sendo predominantemente tropical, favorece o seu desenvolvimento. Este fato é explicado não só pelos fatores climáticos, uma vez que bacterioses são favorecidas sob condições de temperatura e umidade elevadas, ocorrência de chuvas ou irrigação que contribuem para a dispersão do patógeno (Gama et al. 2016), mas também pelo fato de haver um *continuum* cultivo acompanhado por uma grande variedade de culturas, facilitando o desenvolvimento deste grupo de fitopatógenos (Romeiro 2005).

Fitobacterioses são caracterizadas por sintomas como manchas foliares, murchas, crestamentos, podridões, galhas, canela preta, talo oco, sarna, cancrios, entre outros, em culturas de grande expressão econômica e importantes para a segurança alimentar mundial (Agrios 2005; Kado 2010). As famílias *Lysobacteraceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Erwineaceae* e *Comamonadaceae* comportam um número expressivo de gêneros de fitobactérias (Parte et al. 2020). Alguns dos gêneros mais importantes da fitopatologia incluem *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Xylella*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Clavibacter* e ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* (Mansfield et al. 2012).

As fitobacterioses podem conduzir a perdas e danos severos na produção e produtividade, comprometendo não somente o produto agrícola de modo direto, mas

também áreas produtivas inteiras que podem ser inviabilizadas pela simples presença do fitopatógeno (Amorim et al. 2018). Quando consideramos esses fatores, uma quantificação econômica de danos diretos provocados por fitobacterioses é difícil de ser estabelecida. Porém, os danos das doenças podem ser agravados por diversas condições e as perdas econômicas podem se refletir em cifras que ultrapassem a casa dos bilhões de dólares a depender do patógeno e da cultura afetada (Mansfield et al. 2012).

Controle das fitobacterioses

Para bacterioses as principais medidas de controle são baseadas no princípio da exclusão. Porém, a redução de danos unicamente através de um controle preventivo não é possível, sendo necessária a utilização de um manejo integrado com o uso de antibióticos e fungicidas cúpricos, material propagativo sadio ou resistente, se disponível, realização de inspeções periódicas, rastreamento de origem das infecções ou materiais contaminados, termoterapia e quimioterapia de materiais propagativos, rotação de culturas, controle biológico, eliminação de plantas doentes, limpeza de máquinas e implementos agrícolas, dentre outras (Janse 2005; Gama et al. 2016).

Controle Químico

Para o controle químico de bacterioses, normalmente são aplicados antibióticos e/ou fungicidas cúpricos. Os antibióticos são empregados em doenças sistêmicas, mas o principal entrave ao uso consiste no fato de que nem todos antibióticos são registrados em todos os países, e sua eficiência pode ser comprometida, uma vez que a bactéria alvo pode desenvolver resistência ao produto (Janse 2005; Sundin e Wang 2018). No caso dos fungicidas empregados no tratamento de bacterioses de partes aéreas, seu efeito é protetor e podem agir como bactericidas ou bacteriostáticos. Os cúpricos são amplamente

utilizados em operações como podas ou em pulverizações visando um manejo preventivo (Marques et al. 2009; Gama et al. 2016).

Doenças de etiologia bacteriana, como o fogo bacteriano das rosáceas (*Erwinia amylovora*), podem ser controladas com sucesso pelo uso de antibióticos (Rekanovic et al. 2008; Aćimović et al. 2015). Porém, de modo geral, o emprego de antibióticos na agricultura é reduzido em função das dificuldades de aplicação em larga escala, impactos ambientais, competição com uso na medicina e seu elevado custo. Normalmente são recomendados no tratamento de sementes ou culturas de alto valor agregado e com elevados riscos de prejuízos. Estreptomicina, casugamicina e oxitetraciclina são os antibióticos mais utilizados mundialmente (Silva Junior e Behlau 2018).

Uma preocupação quanto ao emprego do controle químico de doenças de plantas é a redução de sua eficiência em função da emergência de populações resistentes aos produtos utilizados, incluindo aqueles que agem em diferentes sítios-alvos (multissítios), como aqueles baseados em cobre, por exemplo (Brent e Hollomon 2007). A resistência pode ser definida como uma característica herdável onde um isolado apresenta redução da sensibilidade a fungicidas/ antibióticos anteriormente eficazes. Termos como “sensibilidade ou tolerância reduzidos” também são empregados para se referir quando os fungicidas apresentam pouco ou nenhum impacto a campo nesses organismos (FRAC 2024). Esse processo pode impactar seriamente a agricultura uma vez que o controle químico é um forte e viável aliado no manejo de doenças (Brent e Hollomon 2007). Acredita-se que o fenômeno pode ocorrer não apenas através da seleção de indivíduos resistentes na população, mas também de modo induzido. Recentemente para o fungo *Cryptococcus gattii*, um patógeno que afeta seres humanos, a exposição sucessiva a doses subinibitórias de piraclostrobina, um fungicida do grupo estrobilurina, reduziu a sensibilidade ao próprio fungicida e induziu a resistência entre fungicidas azólicos,

caracterizando uma indução de resistência cruzada (Bastos et al. 2019). O fenômeno também já foi detectado em *Botrytis cinerea* através da indução de resistência após exposição ao antibiótico pirrolnitrina por até 20 gerações, tornando o patógeno resistente a diferentes grupos de fungicidas (Ajouz et al. 2010).

Resistência de bactérias a bactericidas

Em bactérias, a resistência em função da aplicação e consequente exposição a um antibiótico/ cúprico pode ser explicada pela aquisição de genes de resistência por transferência horizontal ou mutações (Martinez e Baquero 2000). Porém, estudos recentes têm buscado o melhor entendimento do processo de resistência, especialmente pela mutagênese induzida por antibióticos para se vincular diretamente os eventos no nível molecular aos resultados em indivíduos e populações, e melhor entendimento da evolução bacteriana (Revitt-Mills e Robinson 2020). Um estudo com *Escherichia coli* demonstrou que o surgimento da resistência pode estar correlacionado às doses abaixo da mínima concentração inibitória, primordialmente quando a exposição ocorre de modo contínuo. Aumento da resistência aos antibióticos pode ocorrer pela indução de mutações diretamente nos genes ligados à sensibilidade ao antibiótico. Assim, o efeito é um aumento na resistência bacteriana, principalmente para aqueles antibióticos que já dispõem de capacidade inerente de indução de mutações, sendo potencializadas em subdoses (Kucukyildirim 2022).

Bactérias fitopatogênicas têm apresentado resistência a diferentes compostos, incluindo aqueles de ação multissítio e mais amplamente usados na agricultura, como os cúpricos (Areas et al. 2017; Roach et al. 2020). A resistência a antibióticos como kasugamicina, oxitetraciclina, estreptomicina e outros encontra-se distribuída em

diferentes gêneros bacterianos, tais como, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, ocorrendo, na maioria das vezes, por meio da transferência horizontal de genes (Sundin e Bender 1995, Sundin e Wang 2018).

Diversos estudos demonstram que a resistência ao cobre em *Xanthomonas* está relacionada a um operon, o *copLAB*, transmitido de modo horizontal (Behlau et al. 2013; 2017; 2020) e que pode ter localização tanto plasmidial quanto cromossômica (Bibi et al. 2023). A resistência ao ativo é induzida provavelmente por acúmulo do metal na célula (Ramos e Rosato 1996) e a exposição prévia do isolado ao cobre por um determinado período pode induzi-lo a expressar sua resistência fenotipicamente (Basim et al. 2005; Marin et al. 2019; Batista et al. 2021). A essencialidade de cada gene *cop* quanto a expressão da resistência pode variar, conforme demonstrado por Teixeira et al. (2008), onde a inativação do gene *copA* levou *X. axonopodis* pv. *citri* levou à sensibilidade ao cobre, sendo este o gene mais determinante na resistência para esta espécie. A essencialidade do gene pode ser devida a sua função, uma vez que em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, o *copA* codifica uma proteína oxidase localizada na região periplasmática e é também mais determinante na resistência ao ativo do que os genes *copL* e *copB* (Hsiao et al., 2011).

As diferentes espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro também apresentaram tolerância ou resistência a compostos cúpricos multissítios com diversos relatos na literatura (Marco e Stall 1993; Ramos e Rosato 1996; Aguiar et al. 2000; Basim et al. 2005; Mirik et al. 2007; Araújo et al. 2012; Abbasi et al. 2015; Areas et al. 2018; Lai et al. 2021). Esses fatos apontam para a necessidade de um manejo racional dos diferentes recursos visando evitar o surgimento de populações resistentes pela utilização de outros métodos de controle que sejam eficientes e que possam contribuir com a redução dos danos causados por fitobacterioses. A ocorrência de isolados de

Xanthomonas spp. apresentando resistência ao cobre afeta a eficiência do controle e já foi relatada em vários países (Marco e Stall 1983; Basim et al. 2005; Mirik et al. 2007), inclusive no Brasil para tomateiro (Araújo et al. 2012). A resistência é induzida provavelmente por acúmulo do metal na célula (Ramos e Rosato 1996). A presença desse fenômeno pode interferir na eficiência do controle da mancha bacteriana do tomateiro (Mab) causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* - *Xep* (Lai et al. 2021) onde foi demonstrado que mesmo aplicações foliares de doses de cobre comerciais não foram capazes de controlar a doença. Deste modo, a busca por alternativas ao controle químico e que mantenham a eficiência é essencial. Uma alternativa consiste no controle biológico através do uso de microrganismos biocontroladores, ou o uso do controle químico associado ao biológico, prática que muitos produtores já adotam.

Controle Biológico

O controle biológico consiste no uso de um organismo para controlar o patógeno, o qual pode agir sobre este de modo direto, através de mecanismos de antibiose, competição e parasitismo, ou indireto, através da indução de resistência, podendo controlar total ou parcialmente as doenças de etiologia bacteriana (Janse 2005).

O emprego com sucesso de um biocontrolador não é novidade na fitopatologia. O controle de *Agrobacterium tumefaciens* pelos isolados de *A. radiobacter* K84 e K1026 é um exemplo amplamente conhecido (Ryder e Jones 1991). Diversas bactérias são empregadas no biocontrole, tais como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Lysobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia cepacia*, entre outras (Pal e Gardener 2006).

Espécies do gênero *Bacillus* são comumente utilizadas por reunir características que as tornam biocontroladores com boa habilidade de manutenção nos agroecossistemas.

Essas espécies produzem estruturas de sobrevivência, os endósporos, que garantem sua viabilidade sob condições adversas e resistência à ação de substâncias orgânicas que podem danificar sua estrutura, além de produzir antibióticos diversos (Melo 1998; Miljaković et al. 2020). Além disso, *Bacillus* spp. produzem biofilme, facilitando sua colonização, sobrevivência, adaptabilidade, aplicação e eficácia de controle (Karačić et al. 2024). Essa capacidade de *Bacillus* agir de diversas formas possibilita sua ação sobre pontos-chave no desenvolvimento das bactérias, interferindo, por exemplo, na incidência e severidade da doença ao afetar negativamente a colonização e formação de biofilme pelas células bacterianas (Huang et al. 2012). Na cultura do tomateiro, diferentes espécies do gênero agem também pela produção de enzimas extracelulares, sideróforos, compostos voláteis, competição por nutrientes e espaço e resistência sistêmica induzida (ISR) (Karačić et al. 2024).

O uso de *Bacillus* spp. como agente de controle biológico da mancha bacteriana é relatado em diversos estudos (Lanna-Filho et al. 2013; Abbasi e Weselowski 2015; Chandrasekaran et al. 2016; Mates et al. 2019; Chien e Huang 2020; Osdaghi et al. 2021). Para *X. vesicatoria*, agente causal da mancha bacteriana em pimentão, a severidade da doença alcançou valores de redução superiores a 60% tanto para experimentos em estufa quanto em campo, quando plantas foram inoculadas com três cepas de *Bacillus* spp. (individualmente e em combinação). No mesmo estudo também foram descritos aumentos nos teores de matéria seca, diâmetro do caule, comprimento e peso seco da raiz, demonstrando claramente seu potencial como biocontrolador (Mirik et al. 2008). O uso de extratos proteicos do biocontrolador também foi capaz de induzir a resposta de defesa a este patógeno, reduzindo a incidência da doença em tomateiro em até 67% quando comparado ao controle (Lanna-Filho et al. 2013). No Brasil quatro produtos biológicos estão registrados para o controle da Mab: Serenade®, que emprega a linhagem QST 713

de *B. subtilis*, e três produtos com a linhagem BV02 (Bio-imune®, Multi-Attack® e Multi-Guard®).

Efeito hormese na agricultura e usos potenciais

O fenômeno hormese diz respeito a uma resposta bifásica de um organismo induzida por um agente estressor marcada por inibição e estímulo, respectivamente, em altas e baixas doses. Essa resposta pode ser direta (a presença do estressor induz um estímulo) ou por quebra da homeostase (com um dano inicial no organismo e posterior resposta de reparo e proteção estimulada) e é acompanhada por uma amplitude de estímulos e de doses dentro de um intervalo hormético e um ponto máximo de estimulação (Calabrese e Baldwin 2002). O primeiro relato na literatura de que baixas doses de algum agente estressor podem causar estímulo data de 1888 (Schulz 1888; Duke et al. 2017), mas só 55 anos mais tarde foi proposto o termo hormese (Southam e Erlic 1943).

Diferentes substâncias em baixas concentrações, tais como, metais, hidrocarbonetos, pesticidas, fármacos e até mesmo microplásticos podem induzir efeito hormese (Agathokleios et al. 2022). Porém, é importante mencionar que as mesmas doses consideradas subinibitórias que estimulam um organismo, podem ser prejudiciais para uma população inteira e o fitness pode ser afetado, isto é, o que pode ser benéfico a um único indivíduo pode ser danoso a uma população (Calabrese e Baldwin 2002). Na agricultura, os efeitos de baixas doses de diversos produtos são alvos de poucos estudos, pois normalmente são empregadas doses acima do NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) que corresponde ao nível do agente tóxico no qual efeitos deletérios não são observados no organismo (Silva et al. 2018). Uma concentração subinibitória é determinada em condições *in vitro* padronizadas e normalmente controladas, não

refletindo necessariamente o que ocorre no campo (Andersson e Hughes 2014) e seus efeitos podem, portanto, ser totalmente desconhecidos.

O desenvolvimento de plantas pode ser afetado pelo efeito hormese, uma vez que é conhecido que há um *continuum* de exposição a xenobióticos de modo geral, podendo as plantas responderem a moléculas de sinalização de estresse produzidas por outros organismos ativando vias de defesa. Isto pode ser aplicado a diversos organismos em um processo denominado xeno-hormese (Howitz e Sinclair 2008). Os efeitos das doses horméticas devem ser criteriosamente determinados, para futuramente serem considerados na determinação da DL₅₀ (dose capaz de inibir 50% do crescimento) ou CE₅₀ (concentração efetiva contra 50% da população) (Noel et al. 2018) e mensurados seus possíveis impactos em comunidades não-alvos dentro do próprio agroecossistema, uma vez que podem ser causa de emergência de pragas secundárias (Morse 1998).

Por outro lado, o conhecimento sobre o fenômeno da hormese pode ser utilizado para a otimização da produção vegetal. Estudos recentes têm demonstrado o potencial do efeito hormese para aplicação comercial na agricultura. Por exemplo, a utilização de doses subinibitórias de glifosato em eucalipto e cana-de-açúcar, elevou o peso seco da parte aérea, a assimilação de gás carbônico e a condutância estomática, melhorando a fotossíntese das plantas (Nascentes et al. 2018). Diversos parâmetros têm sido avaliados em diferentes estudos evidenciando ganhos relacionados ao crescimento ou acúmulo de matéria seca ou fresca, aumentos da fotossíntese e abertura estomática, da produção de sementes, acúmulo de ácido chiquímico e redução no ciclo das plantas (Brito et al. 2017). Tais efeitos podem ser benéficos para, por exemplo, aumentar o número de colheitas em um ano agrícola ou mesmo para fugir de um período favorável a ocorrência de uma determinada doença como medida de evasão. Agathokleous e Calabrese (2019a) trazem à tona a possibilidade de uso do efeito hormese para incrementos na produtividade,

oferecendo uma alternativa para alcançar a sustentabilidade agrícola. Em outro estudo, os mesmos autores ressaltam a importância de trabalhos envolvendo fitopatógenos para um maior conhecimento da amplitude de doses que se interpõem entre doses de máxima estimulação e doses inibitórias (Agathokleous e Calabrese 2021). O conhecimento da resposta à dose pode trazer informações valiosas sobre aspectos biológicos ainda desconhecidos e que podem conduzir à adaptação e melhores perspectivas de sobrevivência de um organismo (Calabrese e Mattson 2017). O potencial de uso deste conhecimento nos moldes da hormese para beneficiar o controle de doenças tem tomado corpo. A resposta de defesa a estresses bióticos pode ser resultado da exposição de doses subinibitórias de raios ultravioleta C (UV-C) em tratamentos pré-colheita. Em alface a aplicação de UV-C de 0,4 kJ/m² levou a ativação de genes relacionados a defesa e retorno ao estado de equilíbrio dinâmico (homeostase), fazendo com que, mesmo sob ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, a planta fosse capaz de retomar suas funções normais (Sidibé et al. 2022). Dentro desse contexto, também é possível pensar a utilização da hormese na otimização da ação de biocontroladores com doses subinibitórias de produtos químicos usados frequentemente na agricultura, visando potencializar a habilidade competitiva de um biocontrolador pelo estímulo do seu crescimento ou pelo estímulo da produção de toxinas antagonistas ao patógeno, com base nos conhecimentos disponíveis. Por exemplo, a produção de toxinas bacterianas pode sofrer interferência quando doses subinibitórias de antibióticos são aplicadas, podendo sua produção ser antecipada (Drummond et al. 2003) ou mesmo o crescimento e multiplicação bacteriana podem ser aumentados dentro do intervalo hormético (Migliore et al. 2013), mas nada tem sido estudado quanto à aplicação deste conhecimento visando favorecer ou potencializar a ação de um biocontrolador sobre o patógeno.

Efeito hormese na Fitopatologia

O conhecimento de que doses subinibitórias de compostos químicos podem ter efeitos estimulatórios sobre plantas e microrganismos não é algo recente (Southam e Erlic 1943). Porém, os efeitos de subdoses de diferentes compostos têm sido mais amplamente investigados nas áreas da medicina (Agathokleous e Calabrese 2019b, Skaperda et al. 2021, Wan et al. 2024), entomologia (Tang et al. 2021, Yang et al. 2021) ou ambiental, neste caso, normalmente envolvendo compostos poluentes (Fan et al. 2020, Wang et al. 2021, Valencia-Hernandez et al. 2022). Estudos envolvendo hormese na fitopatologia ainda são escassos e se resumem a algumas espécies de fungos e oomicetos (Garzón e Flores 2013). A maioria das pesquisas envolvendo fitopatógenos e o efeito hormese se concentram na última década, principalmente de 2016 à 2018. Estes trabalhos, por sua vez, são fundamentados no uso de fungicidas sistêmicos e patógenos necrotróficos, não havendo até o momento estudos dessa natureza com fungicidas de contato ou patógenos biotróficos (Silva et al. 2018).

Um dos fatores que dificultam a expansão dos estudos é que diversos critérios devem ser atendidos e alta precisão aplicada às metodologias estabelecidas (Garzón et al. 2011). Na relação dose-resposta, por exemplo, o efeito hormese deve atender os seguintes requisitos: i) zona de estimulação dentro de um intervalo de 10 vezes entre as doses aplicadas; ii) as respostas estimulantes devem variar de 30-60% acima do controle livre de tratamento; e iii) o NOAEL deve ser três a seis vezes maior que a DME (dose de máxima estimulação) (Calabrese e Baldwin 1997). Para alcançar a reprodutibilidade desejada em estudos envolvendo hormese, e para a confirmação precisa de seu efeito sobre o fitopatógeno, o pesquisador deve atentar para a elaboração de um sólido desenho experimental com protocolos rigorosamente padronizados, controles negativos

apropriados, execução extremamente cuidadosa e criteriosa, e o uso de repetições múltiplas (Garzón e Flores 2013).

Estímulos de 10% no crescimento foram observados quando subdoses de mefenoxam (1×10^{-10} $\mu\text{g. mL}^{-1}$) foram aplicadas em *Pythium aphanidermatum* (Garzón et al. 2011) enquanto para *Globisporangium ultimum* a DME observada foi de 10,7 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (Pradhan et al. 2017), evidenciando que pode haver diferença de doses estimulatórias entre diferentes espécies e que a variação no estímulo pode ocorrer em limites de estímulos percentuais inferiores aqueles preestabelecidos como critérios de classificação para uma resposta hormética.

Em *Sclerotinia sclerotiorum* foi demonstrado um aumento na taxa de mutações e variação genética em função da aplicação de baixas doses de fungicidas (Amaradasa e Everhart 2016). Para este mesmo patógeno o dimetachlon aplicado em doses subinibitórias em folhas de colza estimulou, dentre isolados resistentes e sensíveis, aumentos na virulência que corresponderam a 43,41% e 59,80% levando ao surgimento de lesões muito maiores que o controle (Zhou et al. 2014). Aumento na tolerância de *Sclerotinia homoeocarpa* ao fungicida tiofanato metílico e estímulo no crescimento de até 19,7% foi detectado quando o fungo foi exposto a doses subinibitórias do fungicida após condicionamento (Pradhan et al. 2018), um tipo de hormese que se caracteriza pelo aumento da tolerância a um agente estressor em função da prévia exposição do organismo a doses subinibitórias do mesmo agente (Calabrese e Baldwin 2002).

No Brasil, um único estudo com o fungo *Lasiodiplodia theobromae* foi conduzido, onde foi confirmado o efeito hormético induzido por tiofanato-metílico em doses subinibitórias estimulando o crescimento micelial de isolados sensíveis e resistentes em até 20% acima do controle, na dose de 0,7 $\mu\text{g/mL}$, e 31% na dose de 1 $\mu\text{g/mL}$. O estudo mostrou que o intervalo estimulatório pode ser particularmente grande para isolados

resistentes variando de 0,01 µg/mL a 1000 µg/mL. Além disso, efeitos estimulatórios na severidade da doença em frutos de mamão foram observados quando trifloxistrobina e crezoxim-metílico (estrobilurinas) foram aplicados a 100 µg mL⁻¹ e tiabendazol (benzimidazol) a 1940 µg mL⁻¹ (dose comercial), levando a lesões 15%, 24% e 47% respectivamente, maiores que o controle. Enquanto, para o isolado sensível, crezoxim-metílico estimulou a virulência do isolado em 47% (Silva 2024).

A indução de efeito hormese por diferentes agentes estressores, tais como fungicidas e antibióticos, não tem registro na fitobacteriologia apesar de gêneros como *Pseudomonas* e *Burkholderia*, que reúnem patógenos importantes tanto na área médica como na fitopatologia, serem amplamente estudados.

O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas*, atualmente pertencente à família Lysobacteraceae (syn: Xanthomonadaceae), é um importante gênero que engloba muitas espécies fitopatogênicas. É caracterizado por bactérias gram-negativas baciliformes, com um flagelo polar, capaz de formar cápsulas, e colônias distinguíveis pela pigmentação normalmente amarela intensa em placa de ágar nutriente (Bedendo e Belasque 2018). Essa coloração é devida à presença da xantomonadina, um pigmento insolúvel em água associado à membrana externa da maioria das espécies do gênero, sendo também utilizado como marcador quimiotaxonômico, além de exercer importante função na proteção contra estresses ambientais (Sharma et al. 2014)

Trata-se de um gênero adaptado a um vasto e diverso grupo de plantas hospedeiras podendo causar doenças isoladamente ou formando complexos de espécies (Jones et al. 2004). Atualmente cerca de 34 espécies são reconhecidas para o gênero *Xanthomonas* e 42 sinônimas disponíveis na LPSN – “*List of Prokaryotic names with Standing in*

Nomenclature” (Parte et al. 2020) além de muitos patovares que, embora não sejam reconhecidos pelo sistema internacional de nomenclatura, são de importância prática fundamental na fitopatologia (Bull et al. 2008). Como exemplos de bacterioses importantes no Brasil, destacam-se *X. campestris* pv. *campestris* (podridão negra das brássicas), *X. citri* subsp. *citri* (cancro cítrico), *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (mancha angular da mangueira), *X. citri* pv. *viticola* (cancro bacteriano da videira), *X. citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (crestamento bacteriano do feijoeiro) e o complexo *X. euvesicatoria*, *X. hortorum* e *X. vesicatoria* (mancha bacteriana do tomateiro e pimentão) (Gama et al. 2016).

A gama de hospedeiros de *Xanthomonas* já ultrapassa 400 espécies vegetais, dentre monocotiledôneas e dicotiledôneas (Jacques et al. 2016), por vezes com elevado grau de especificidade para espécies ou famílias botânicas e com impacto em diversos processos fisiológicos dependendo do tecido infectado (Sharma et al. 2014). Além das culturas de importância econômica, *Xanthomonas* também podem ter plantas daninhas entre suas hospedeiras, podendo atuar como fonte de inóculo e auxiliar na sua sobrevivência (Jacques et al. 2016; Marcuzzo 2011). Embora não detenha de boa capacidade de sobrevivência no solo, a bactéria é capaz de sobreviver em restos culturais, sementes, plantas daninhas e hospedeiras alternativas (Quezado-Duval e Lopes 2010; Marcuzzo 2011). A capacidade de viver como endófitas sem causar doença, e a capacidade de troca de material genético entre isolados virulentos e avirulentos, são aspectos importantes tanto para sua sobrevivência quanto para a evolução da patogenicidade e amplamente estudados em *Xanthomonas* (Jacques et al. 2016; Timilsina et al. 2020; Pena et al. 2024). Um aspecto também importante na sobrevivência, colonização e severidade da doença causada por *Xanthomonas* spp. é a produção de biofilmes, um importante fator de virulência. Biofilmes são compostos por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos que

desempenham importante papel na proteção da bactéria contra agentes bióticos e abióticos (Flemming e Wingender 2010). A produção de biofilme bacteriano está relacionada ao pilus tipo IV, importante na movimentação, adesão e permanência na superfície foliar, auxiliando na colonização da filosfera (Felipe et al. 2018). Diversos fatores podem influenciar a produção do biofilme bacteriano, tais como pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura, presença de antibióticos e características do isolado (Alotaibi e Bukhari 2021). O biofilme tem fundamental importância na manutenção de uma massa crítica de bactérias após a penetração no tecido (Danhorn e Fuqua 2007). Dada sua essencialidade, é imprescindível a tomada de medidas que reduzam a produção de biofilme pela realização de pulverizações foliares de antibióticos ou combinações com produtos cúpricos (Worthington et al. 2012).

A dispersão da bactéria ocorre principalmente através de respingos de chuva ou água de irrigação, tratos culturais ou uso de sementes e mudas contaminadas. Espécies de *Xanthomonas* penetram via aberturas naturais (estômatos ou hidatódios), ferimentos e lesões (Kurozawa e Pavan 2005). A colonização e multiplicação das células bacterianas pode se dar em caules, ramos, folhas, flores e botões florais, frutos e sementes. A bactéria faz uso, então, de um arsenal enzimático que auxilia em todo o processo de colonização e supressão da resposta de defesa da planta (Jacques et al. 2016). Assim, infecções sistêmicas nos tecidos vasculares levam a cancos e murchas ao interromperem o fluxo de água e nutrientes para os demais locais, enquanto infecções localizadas e restritas ao mesófilo levam a manchas foliares que interferem no processo fotossintético (Sharma et al. 2014). As infecções resultantes são favorecidas por condições de elevada umidade e precipitação, e temperaturas entre 20 e 30°C. As epidemias ocorrem em função de sua rápida multiplicação, disseminação, penetração e colonização nos tecidos do hospedeiro (Kurozawa e Pavan 2005).

A mancha bacteriana (Mab) do tomateiro

A cultura do tomateiro e sua importância

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*), de grande valor econômico, é constantemente atacada por diversos fitopatógenos de etiologia variada (Kurozawa e Pavan 2005). O Brasil é atualmente o 8º maior produtor mundial do fruto, sendo China, Índia e Turquia os responsáveis pelas maiores produções, respectivamente (FAOSTAT 2024). No ano de 2023, o Brasil alcançou uma produção de 3,9 milhões de toneladas em uma área de 56.000 ha correspondendo a uma produtividade média de 70 ton/ha (IBGE 2024). Algumas regiões são particularmente importantes por reunirem características climáticas que favorecem o desenvolvimento da cultura, como a Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno (RIDE-DF) que engloba áreas do Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais. Esta região se destaca pelo cultivo convencional, para consumo *in natura*, ou para a indústria, movimentando o comércio local e contribuindo na geração de emprego e renda (CONAB 2021). Desta forma, danos a cultura causados por doenças podem ter impactos significativos para o país e mais desastrosos ainda localmente. Há, então, uma necessidade de serem aplicadas medidas de controle de doenças que reduzam os riscos de perdas sem comprometer o abastecimento alimentar, a fim de garantir o desenvolvimento comercial e social.

Etiologia

A mancha bacteriana (Mab) que afeta o tomateiro e *Capsicum* spp. merece destaque entre as bacterioses importantes causadas por *Xanthomonas*. Três espécies estão associadas a doença, a saber: *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (*Xee*), *X. vesicatoria* (*Xv*) e *X. hortorum* pv. *gardneri* (*Xhg*) (Jones et al. 2004; Barak et al. 2016; Constantin et al. 2016; Morinière et al. 2020; Osdaghi et al.

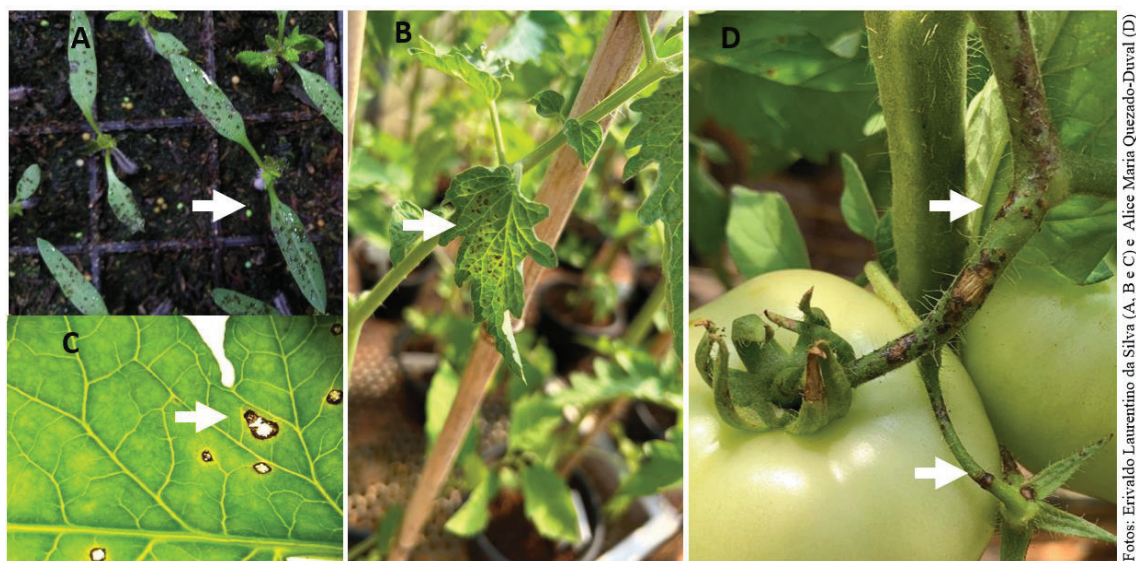
2021). *Xhg* e *Xee* ocorrem predominantemente em tomate e pimentão, enquanto *Xv* é associada ao tomateiro (Osdaghi et al. 2021). Estudos recentes sugerem uma expansão da gama de hospedeiros de *Xep*, normalmente associada ao tomateiro, uma vez que o patógeno foi isolado de pimentas (*C. frutescens*) com sintomas de Mab (Potnis et al. 2015; Newberry et al. 2019; Liao et al. 2024).

A distinção entre as espécies causadoras da Mab é amplamente discutida na literatura. Por exemplo, isolados de *Xep* e *Xv* possuem forte atividade amilolítica e pectolítica, enquanto *Xee* e *Xhg* são fracamente amilolíticas ou não amilolíticas e não específicas (Jones et al. 2004; Osdaghi et al. 2021). Os avanços na biologia molecular e técnicas como a hibridação DNA:DNA, genotipagem via PCR e sequenciamento genômico têm contribuído para a elucidação da etiologia da doença e distinção entre as espécies associadas.

As espécies causadoras da Mab foram detectadas nos continentes Africano, Americano (Brasil, Canadá e EUA), Oceania (Austrália), leste da Europa e sudeste da Ásia, tendo restrita ocorrência na Europa Ocidental (Osdaghi et al. 2021). No Brasil todas as espécies estão presentes em tomateiro, destacando-se *Xep* como a espécie com maior frequência no Brasil central, e no estado do Goiás e no Distrito Federal (Araújo et al. 2017). Um ponto importante é a possibilidade de ocorrerem alterações na dinâmica populacional no campo e *Xep* se tornar dominante em relação aos demais agentes causadores da doença (Horvath et al. 2012; Burlakoti et al. 2018; Rotondo et al. 2022; Chen et al. 2024), o que pode estar atrelado à capacidade de *Xep* de produzir bacteriocinas inibitórias a outras espécies causadoras da doença (Hert et al. 2009).

Sintomatologia

A doença se manifesta através de manchas encharcadas circundadas por áreas cloróticas que se tornam necrosadas por toda parte aérea da planta. Nas folhas, lesões encharcadas evoluem e escurecem, tornando-se marrons, de formato irregular e de aparência oleosa (Figura 1). Tal sintomatologia é facilmente percebida em sementeiras e campos irrigados por aspersão. Lesões podem apresentar dimensões de até 2-3 mm de diâmetro e coalescer e, em casos mais severos, pode ocorrer desfolha e a consequente exposição dos frutos ao sol pode levar frutos a sofrerem escaldadura. Para *Xep* uma característica importante é o fato de o tecido infectado sofrer uma restrição ao redor da lesão com abscisão do tecido ao entorno. Em frutos de tomate os sintomas se apresentam quando ainda verdes, surgindo pequenos pontos, encharcados ou ligeiramente salientes, verde-claros com halos brancos esverdeados, tornando-se marrom-escuros com a evolução da lesão e ligeiramente deprimidos com superfície áspera, semelhante a verrugas. Em sépalas sintomas incluem lesões marrons que levam a áreas necrosadas, enquanto no caule as lesões se apresentam de formato estreito e alongado (< 3 mm de diâmetro) que se tornam marrons e ásperas (Osdaghi et al. 2021).



Fotos: Errvaldo Laurentino da Silva (A, B e C) e Alice Maria Quezado-Duval (D)

Figura 1: Sintomas da mancha bacteriana do tomateiro em mudas (A), folhas (B e C) e haste, estruturas florais de frutos do tomateiro (D) inoculados com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Setas brancas indicam áreas lesionadas.

Epidemiologia e manejo

Além das culturas do tomateiro e pimentão, hospedeiros alternativos de *Xep* incluem plantas consideradas ervas daninhas e espontâneas, solanáceas e não solanáceas contribuindo para sua manutenção no ambiente (Santos et al. 2020; Osdaghi et al. 2021) e tornando mais difícil o manejo. Material propagativo contaminado pode ter um papel fundamental na introdução da doença em áreas livres devido à capacidade de sobrevivência da bactéria em sementes e mudas (Osdaghi et al. 2021). Sementes contaminadas com a bactéria são o principal meio de dispersão da bactéria a longas distâncias. Neste caso, *Xanthomonas* se associa ou contamina a superfície da semente e se encontra difusa na polpa do fruto (Xhemali et al. 2024). O transporte de mudas em condições de cultivo para transplântio (Simonton et al. 2021), altas densidades de plantas,

irrigação inadequada (aérea), umidade e temperaturas elevadas favorecem a rápida disseminação da Mab, podendo conduzir a graves surtos da doença. O período de incubação no campo varia de 5 a 7 dias, a depender das condições ambientais (Abrahamian et al. 2021), fazendo com que o patógeno seja introduzido na área e plantas permaneçam assintomáticas, quando o inóculo é oriundo de transplantes contaminados (Abrahamian et al. 2019). Sob condições favoráveis à ocorrência de epidemias, a doença pode causar sérios prejuízos com redução e comprometimento da qualidade e quantidade da produção (Ritchie 2000). Para reduzir os riscos de danos e aplicar adequadamente um manejo da doença, a identificação correta do patógeno na área é fundamental. Atualmente diversos métodos podem auxiliar nesta tarefa, como o uso de meios de cultura convencionais, seletivos e semisseletivos, técnicas sorológicas e aquelas altamente específicas e sensíveis baseadas em PCR. Fatores como a nutrição da planta, concentração de inóculo e expressão de genes de resistência aos produtos utilizados podem também influenciar o desenvolvimento da doença (Osdaghi et al. 2021). O uso de sementes e transplantes saudáveis, rotação de culturas, aplicação de fungicidas cúpricos, controle biológico e uso de bacteriófagos são algumas das ferramentas possíveis de serem utilizadas no manejo (Ritchie 2000). O controle químico com o emprego de cúpricos, sozinhos ou em combinação, apresentam benefícios, porém, também levanta questões relacionadas à contaminação ambiental e debates quanto a redução da eficiência em função da já mencionada resistência (Osdaghi et al. 2021). Melhorias e avanços significativos e promissores no aumento da eficiência dos produtos e redução dos efeitos danosos sobre as plantas, como a fitotoxidez, têm sido relatados (Fan et al. 2021).

Acreditava-se que em *Xep* o *copLAB* era transmitido apenas via transferência horizontal através de um plasmídeo conjugativo, entretanto, recentemente foi demonstrando que isolados de *Xep* podem conter o gene no cromossomo. Os autores

também sugeriram que os genes codificados cromossomicamente podem dar a *Xep* alguma vantagem de fitness sobre a resistência via plasmídeo (Bibi et al. 2023).

Justificativa

As espécies fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* causam notáveis problemas na agricultura, sendo imprescindível a utilização de manejo integrado empregando-se também métodos alternativos de controle. O uso racional dos diferentes recursos disponíveis atualmente para o manejo de doenças de plantas é uma das chaves para o sucesso do controle de fitobacterioses (Marin et al. 2019).

A cultura do tomateiro apresenta uma elevada importância no cenário mundial e brasileiro, sendo o tomate indústria particularmente importante para a região do RIDE-DF. Dentre as doenças que afetam essa cultura, Mab destaca-se por sua relevância no Brasil e no mundo. Vários produtos à base de cobre, antibióticos e extratos vegetais estão registrados para controle da Mab no tomateiro (Agrofit 2024). O uso conjunto dos controles químico e biológico pode levar a uma otimização das práticas de controle, bem como contribuir para evitar riscos da emergência de populações resistentes aos produtos químicos. A presença de isolados de *Xanthomonas* resistentes ao cobre em tomates brasileiros reforça a importância de se conhecer a dinâmica da emergência da resistência bacteriana, suas bases genéticas, como a presença do gene *copA*, bem como a relação da resistência e subdosagens dos produtos antibióticos/cúpricos utilizados.

Na Fitopatologia o efeito hormese tem sido caracterizado em fungos e oomicetes, mas entre as bactérias fitopatogênicas sua ocorrência ainda é pouco investigada, tornando-se uma lacuna no conhecimento, tanto no que diz respeito ao seu potencial danoso em aumentar a incidência e/ou severidade da doença, quanto em utilizar seu conhecimento visando encontrar uma dose favorável a um biocontrolador.

Objetivo geral

Investigar a ocorrência de hormese em isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* – *Xep*, pelo estudo do efeito de doses subinibitórias de diferentes produtos cúpricos sobre seu crescimento, virulência e na eficiência do controle biológico pelo uso de *Bacillus* spp.

Objetivos específicos

1. Caracterizar isolados de *Xep* quanto à presença do gene *copA*, via PCR, determinar a sensibilidade *in vitro* ao cobre (Cu) e a concentração mínima inibitória para cada combinação *Xep* + Cu;
2. Investigar a ocorrência do efeito hormese por doses subinibitórias de cobre em *Xep*, se sua ocorrência é comum a todos isolados ou se é isolado-específica, e na interação *Xep*-tomateiro;
3. Comparar dois produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. quanto à eficiência no controle da mancha bacteriana;
4. Avaliar o efeito de doses subinibitórias de formulações cúpricas sobre *Bacillus subtilis* QST 713 (BS) – Serenade® e *B. amyloliquefaciens* MBI600 (BA) - Duravel® para fins de aprimoramento de controle de *Xep*.

Referências

Abbasi PA, Weselowski B (2015) Efficacy of *Bacillus subtilis* QST 713 formulations, copper hydroxide, and their tank mixes on bacterial spot of tomato. Crop Protection 74:70–76

- Abrahamian P, Sharma A, Jones JB, Vallad GE (2021) Dynamics and spread of bacterial spot epidemics in tomato transplants grown for field production. *Plant Disease* 105: 566–575
- Abrahamian P, Timilsina S, Minsavage GV, Potnis N, Jones JB, Goss EM, Vallad GE (2019) Molecular epidemiology of *Xanthomonas perforans* outbreaks in tomato plants from transplant to field as determined by single nucleotide polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e01220
- Aćimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC (2015) Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in plant science* 6:16
- Agathokleous E, Calabrese EJ (2019a). Hormesis can enhance agricultural sustainability in a changing world. *Global Food Security* 20:150–155
- Agathokleous E, Calabrese EJ (2019b) Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. *Toxicology* 425:152249
- Agathokleous E, Calabrese EJ (2021) Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi: A critical determinant of successful agriculture and environmental sustainability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69:4561–4563
- Agathokleous E, Barceló D, Rinklebe J, Sonne C, Calabrese EJ, Koike T (2022) Hormesis induced by silver iodide, hydrocarbons, microplastics, pesticides, and pharmaceuticals: Implications for agroforestry ecosystems health. *Science of The Total Environment* 820:153116
- Agrofit – Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em 2024

- Aguiar LA, Kimura O, Castilho AMC, Castilho KSC, Ribeiro RLD, Akiba F, Carmo MGF (2000) Copper resistance in Brazilian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* of pepper and tomato. *Agronomia* 34:78-82
- Ajouz S, Decognet V, Nicot PC, Bardin M (2010) Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. *Fungal Biology* 114:949-954
- Amaradasa BS, Everhart SE (2016) Effects of sublethal fungicides on mutation rates and genomic variation in fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS ONE* 11:e0168079
- Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (2018) Manual de fitopatologia - princípios e conceitos. 1. 5th. Editora Agronômica Ceres Ltda, Ouro Fino
- Andersson DI, Hughes D (2014) Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 12: 465–478
- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2017) Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathology* 66:159-168
- Araújo ER, Pereira RC, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM, Café-Filho AC (2012) sensitivity of xanthomonads causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and *in vivo* infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Journal of Plant Pathology* 94: 79-87
- Areas MS, Gonçalves RM, Soman JM, Souza Filho RC, Gioria R, Silva Junior TAFD, Maringoni AC (2018) Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 90:2375–2380

- Barak JD, Vancheva T, Lefeuvre P, Jones JB, Timilsina S, Minsavage GV, Vallad GE, Koebnik R (2016) Whole-Genome Sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Clarify Taxonomy and Reveal a Stepwise Erosion of Type 3 Effectors. *Frontiers in Plant Science* 7:1805
- Basim H, Minsavage GV, Stall RE, Wang JF, Shanker S, Jones JB (2005) Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8284-91
- Bastos RW, Freitas GJC, Carneiro HCS, Oliveira LVN, Gouveia-Eufrasio L, Santos APN, Moyrand F, Maufrais C, Janbon G, Santos DA (2019) From the environment to the host: how non-azole agrochemical exposure affects the antifungal susceptibility and virulence of *Cryptococcus gattii*. *Science of the Total Environment* 681: 516-523
- Bedendo IP, Belasque J. Bactérias fitopatogênicas. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. *Princípios e Conceitos*. Ceres, 2018, Minas Gerais, p 143-160
- Behlau F, Gochez AM, Jones JB (2020) Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology* 45: 200–212
- Behlau F, Gochez AM, Lugo AJ, Elibox W, Minsavage GV, Potnis N, White FF, Ebrahim M, Jones JB, Ramsubhag A (2017) Characterization of a unique copper resistance gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. *European Journal of Plant Pathology* 147: 671–681
- Behlau F, Hong JC, Jones JB, Graham JH (2013) Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus associated xanthomonads. *Phytopathology* 103:409-418

- Bibi S, Weis K, Kaur A, Bhandari R, Goss E, Jones JB, Potnis N (2023) A Brief Evaluation of a Copper Resistance Mobile Genetic Island in the Bacterial Leaf Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Phytopathology* 113:1394-1398
- Brent KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it be Managed? FRAC Monograph 1. 2nd Ed. Brussels, CropLife International, Brussels: 55
- Brito IP, Tropaldi L, Carbonari CA, Velini ED (2017). Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Management Science* 74:1064–1070
- Bull CT, de Boer SH, Denny P, Firrao G, Fischer-Le Saux M, Saddler GS, Scortichini M, Stead DE, Takikawa Y (2008) Demystifying the nomenclature of bacterial plant pathogens. *Journal of Plant Pathology* 90:403–417
- Burlakoti RR, Hsu CF, Chen JR, Wang JF (2018) Population dynamics of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper during 27 years across Taiwan. *Plant Disease* 102:1348-1356
- Calabrese EJ, Baldwin LA (1997) The dose determines the stimulation [and poison]: Development of a chemical hormesis database. *International Journal of Toxicology* 16: 545-559
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology* 21: 91–97
- Calabrese EJ, Mattson MP (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ aging and mechanisms of disease* 3:13
- Chandrasekaran M, Belachew ST, Yoon E, Chun EC (2016) Expression of β -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*. Journal of General Plant Pathology 83:7–13

Chen J-R, Aguirre-Carvajal K, Xue D-Y, Chang H-C, Arone-Maxwell L, Lin Y-P, Armijos-Jaramillo V, Oliva R (2024) Exploring the genetic makeup of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in Taiwan: evidence of population shift and local adaptation. Frontiers in Microbiology 15:1408885

Chien YC, Huang CH (2020) Biocontrol of bacterial spot on tomato by foliar spray and growth medium application of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma asperellum*. European Journal of Plant Pathology 156:995–1003

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Batata, cebola e tomate: caracterização da produção e da comercialização na Região Integrada de Desenvolvimento Econômico do Distrito Federal e Entorno – Ride-DF. Brasília, DF: Conab, 2021 p 29

Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. Plant Pathology 65: 792–806

Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Microbiology 61:401–22

Doidge EM (1921) A tomato canker. Annals of Applied Biology 7:407–430

Drummond LJ, Smith DGE, Poxton IR (2003) Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. Journal of Medical Microbiology 52:1033–1038

- Duke SO, Kudsk P, Solomon K (2017) Pesticide dose: effects on the environment and target and non-target organisms ACS symposium series. American Chemical Society 1249: 9780841232099
- Fan D, Wang S, Guo Y, Zhu Y, Agathokleous E, Ahmad S, Han J (2020) Cd induced biphasic response in soil alkaline phosphatase and changed soil bacterial community composition: The role of background Cd contamination and time as additional factors. *Science Total Environment* 757:143771
- Fan Q, Liao Y-Y, Kunwar S, Da Silva S, Young M, Santra S, Minsavage GV, Freeman JH, Jones JB, Paret ML (2021) Antibacterial effect of copper composites against *Xanthomonas euvesicatoria*. *Crop Protection* 139:105366
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>, acesso em junho de 2024
- Felipe V, Romero AM, Montecchia MS, Vojnov AA, Bianco MI and Yaryura PM (2018) *Xanthomonas vesicatoria* virulence factors involved in early stages of bacterial spot development in tomato. *Plant Pathology* 67: 1936–1943
- Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623–33
- FRAC– Fungicide Resistance Action Committee. How does fungicide resistance evolve? Disponível em: <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/background> . Acesso em junho de 2024
- Gama MAS, Nicoli A, Guimarães LMP, Lopes UP, Michereff SJ (2016) Estado da arte em fitobacterioses tropicais. Recife: EDUFRPE 308p
- Garzón CD, Flores FJ (2013) Hormesis: Biphasic dose-reponse to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. In: Nita M (ed.) *Fungicides -*

- showcases of integrated plant disease management from around the world. Rijeka: InTech pp. 311-328
- Garzón CD, Molineros JE, Yanez JM, Flores FJ, Jimenez- Gasco MM, Moorman GW (2011) Sublethal doses of mefenoxam enhance *Pythium* damping-off of geranium. Plant Disease 95:1233-1238
- Ghazay F Alotaibi, Mamdouh A Bukhari (2021) Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. American Journal of Biomedical Science and Research 12: AJBSR.MS.ID.001820
- Hert AP, Marutani M, Momol MT, Roberts PD, Olson SM, Jones JB (2009) Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. Applied and Environmental Microbiology 75:3323–3330
- Horvath DM, Stall RE, Jones JB, Pauly MH, Vallad GE, Dahlbeck D, Staskawicz BJ, Scott JW, Park S (2012) Transgenic resistance confers effective field level control of bacterial spot disease in tomato. PLoS One 7: e42036
- Howitz KT, Sinclair DA (2008) Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. Cell 133:387–391
- Hsiao YM, Liu YF, Lee PY, Hsu PC, Tseng SY, Pan YC (2011) Functional characterization of *copA* gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Journal Agriculture and Food Chemistry 59: 9290-302
- Huang T-P Tzeng DD-S, Wong ACL, Chen C-H, Lu K-M, Lee Y-H, Huang W-D, Hwang B-F, Tzeng K-C (2012) DNA Polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. PLoS One 7:e42124

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2024) LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados> Acesso em junho de 2024

Jacques M-A, Arlat M, Boulanger A, Boureau T, Carrere S, Cesbron S, Chen N, WG, Cociancich S, Darrasse A, Denance N, Saux MF-L, Gagnevin L, Koebnik R, Lauber E, Noel LD, Pieretti I, Portier P, Pruvost O, Rieux A, Robene I, Royer M, Szurek B, Verdier V, Vernière, C (2016). Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. Annual Review of Phytopathology 54:163–187

Janse JD (2005) Phytopathology: principles and practice. Wallingford: CABI Publishing p. 360

Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW (2004) Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic of Applied Microbiology 27:755-762

Kado CI (2010) Plant bacteriology. St. Paul: APS Press p. 336

Karačić V, Miljaković D, Marinković J, Ignjatov M, Milošević D, Tamindžić G, Ivanović M (2024) *Bacillus* Species: Excellent Biocontrol Agents against Tomato Diseases. Microorganisms 12:457

Kucukyildirim, S (2022) Whole-population genomic sequencing reveals the mutational profiles of the antibiotic-treated *Escherichia coli* populations. Biologia 77:525–531

Kurozawa C, Pavan MA (2005) Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. Manual de Fitopatologia. Agronômica Ceres 2:614-615

- Lai, Y-R, Lin, C-H, Chang, C-P, Ni, H-F, Tsai, W-S, Huang, C-J. (2021) Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Plant Protect Science 57: 206–216
- Lanna-Filho R, Souza RM, Magalhães MM, Villela L, Zanotto E, Ribeiro-Júnior PM, Resende MLV (2013) Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. Tropical Plant Pathology 38:295–302
- Liao, Y-Y, Montalban KM, Panwala R, Totslin N, Guedira AM, Hernandez K, Huerta AI (2024) First Report of *Xanthomonas perforans* Causing Bacterial Spot of Pepper (*Capsicum annuum*) in North Carolina. Plant Disease 00:ja
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13: 614–629
- Marco GM, Stall RE (1983) Control of bacterial spot of pepper initiated by strains *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. Plant Disease 67:779-781
- Marcuzzo LL (2011) Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*. Ágora: Revista de divulgação científica 16:13–19
- Marin VR, Ferrarezi JH, Vieira G, Sass DC (2019) Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35:72
- Marques E, Uesugi CH, Ferreira MASV (2009) Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Tropical Plant Pathology 34: 406-411
- Martinez JL, Baquero F (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy 44:1771–1777

- Mates KPA, Pontes NC, Alfred-Vieira BA (2019) *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. *Biological Control* 137:104013
- Melo IS (1998), Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo IS and Azevedo JL (Eds.). *Controle Biológico*. Embrapa 1:17-30
- Migliore L, Rotini A, Thaller MC (2013) Low doses of tetracycline trigger the *E. coli* growth: a case of hormetic response. *Dose Response* 11:550-7
- Miljaković D, Marinković J, Balešević-Tubić S (2020) The Significance of *Bacillus* spp. in Disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* 13:1037
- Mirik M, Aysan Y, Cinar O (2007) Copper-resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89:153-154
- Mirik M, Aysan Y, Cinar O (2008) Biological control of bacterial spot disease of pepper with *Bacillus* strains. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 32:381-390
- Morinière L, Burlet A, Rosenthal ER, Nesme X, Portier P, Bull CT (2020) Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995. *Systematic and Applied Microbiology* 43: 126087
- Morse JG (1998) Agricultural implications of pesticide-induced hormesis of insects and mites. *Human and Experimental Toxicology* 17:266-9
- Nascentes RF, Carbonari CA, Simões PS, Brunelli MC, Velini ED, Duke SO (2018) Low doses of glyphosate enhance growth, CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. *Pest Management Science* 74:1197–205

- Newberry EA, Bhandari R, Minsavage GV, Timilsina S, Jibrin MO, Kemble J, Sikora EJ, Jones JB, Potnis N (2019) Independent evolution with the gene flux originating from multiple *Xanthomonas* species explains genomic heterogeneity in *Xanthomonas perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* 85:e00885-19
- Noel ZA, Wang J, Chilvers MI (2018) Significant influence of EC50 estimation by model choice and EC50 type. *Plant Disease* 102:708-714
- Osdaghi E, Jones JB, Sharma A, Goss EM, Abrahamian P, Newberry EA, Potnis N, Carvalho R, Choudhary M, Paret ML, Timilsina S, Vallad GE (2021) A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. *Molecular Plant Pathology* 00:1–20
- Pal KK, McSpadden Gardener B (2006) Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M (2020) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70:5607-5612
- Pena MM, Bhandari R, Bowers RM, Weis K, Newberry E, Wagner N, Pupko T, Jones JB, Woyke T, Vinatzer BA, Jacques MA, Potnis N (2024) Genetic and Functional Diversity Help Explain Pathogenic, Weakly Pathogenic, and Commensal Lifestyles in the Genus *Xanthomonas*. *Genome Biology and Evolution* 16: evae074
- Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB (2015) Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16:907-20
- Pradhan S, Flores FJ, Molineros JE, Walker NR, Melouk H, Garzón CD (2017) Improved assessment of mycelial growth stimulation by low doses of mefenoxam in plant

- pathogenic *Globisporangium* species. European Journal of Plant Pathology 147:477-487
- Pradhan S, Miller L, Marcillo V, Grachet NG, Molineros JE, Walker NR, Melouk H, Garzón CD (2018) Hormetic effects of thiophanate-methyl in multiple isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. Plant Disease 103:89-94
- Quezado-Duval AM, Lopes CA (2010) Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Embrapa hortaliças ISSN 1415-3033
- Ramos GBA, Rosato YB (1996) Copper accumulation in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Brazilian Journal of Genetics 19: 551-554
- Rekanovic E, Milijasevic S, Filajdic N, Gavrilovic V (2008) Efficacy of antibiotics and copper compounds in *Erwinia amylovora* control in Serbia. Acta Horticulturae 800:875–878
- Revitt-Mills SA, Robinson A (2020) Antibiotic-induced mutagenesis: under the microscope. Frontiers in Microbiology 11:585175
- Ritchie DF (2000) Bacterial spot of pepper and tomato. The Plant Health Instructor. Disponível em https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/Bacterials_pot.aspx acesso em junho de 2021
- Roach R, Mann R, Gambley C, Shivas R, Chapman T, Rodoni B (2020) Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. Crop Protection 127:104923
- Romeiro RS (2005) Bactérias fitopatogênicas. 2. ed. Viçosa: UFV p. 417

- Rotondo F, Bernal E, Ma X, Lewis Ivey ML, Sahin F, Francis MD, Miller SA (2022) Shifts in *Xanthomonas* spp. causing bacterial spot in processing tomato in the Midwest of the United States. *Canadian Journal of Plant Pathology* 00:1-16
- Ryder M, Jones D (1991) Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026. *Australian Journal of Plant Physiology* 18:571
- Santos LVS, Melo EA, Silva AMF, Felix KCS, Quezado-Duval AM, Albuquerque GMR, Gama MAS, Souza EB (2020) Weeds as alternate hosts of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and *X. campestris* pv. *campestris* in vegetable-growing fields in the state of Pernambuco, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 45:484–492
- Schulz H (1888) Ueber Hefegifte. *Pflügers Arch. European Journal of Physiology* 42:517–541
- Sharma A, Gautam S, Wadhawan S (2014) *Xanthomonas*. In: Batt CA, Tortorello MS (Eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology* p. 811-817
- Sidibé A, Charles MT, Lucier J-F, Xu Y, Beaulieu C (2022) Preharvest UV-C Hormesis induces key genes associated with homeostasis, growth and defense in lettuce inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Frontiers in Plant Science* 12:793989
- Silva EL, Garzón CD, Lopes UP (2024) Hormetic-like effect and management of thiophanate-methyl resistance in *Lasiodiplodia theobromae* isolates. *Tropical Plant Pathology* doi: <https://doi.org/10.1007/s40858-024-00673-1>
- Silva EL, Freitas-Lopes RL, Lopes UP (2018) Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi and oomycetes: current status and research perspectives. *Revisão anual de patologia de plantas* 26: 69-80

- Silva Junior G, Behlau F (2018) Controle químico. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. Princípios e Conceitos. Ceres, Minas Gerais p 239-260
- Simonton TE, Robinson D, Gillard C, Jordan K, Trueman CL (2021) Transmission of *Xanthomonas gardneri* to tomato seedlings during transportation and transplanting. Crop Protection 141:105472
- Skaperda Z, Tekos F, Vardakas P, Nepka C, Kouretas D (2021) Reconceptualization of hormetic responses in the frame of redox toxicology. International journal of molecular sciences 23: 49
- Southam CM, Erhlich J (1943) Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. Phytopathology 33:517–524
- Sundin GW, Bender CL (1995) Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. Applied and Environmental Microbiology 61:2891-7
- Sundin GW, Wang N (2018) Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. Annual Review Phytopathology 56:161–180
- Tang Q, Ma K, Chi H, Hou Y, Gao X (2019) Transgenerational hormetic effects of sublethal dose of flupyradifurone on the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). PLoS ONE 14: e0208058
- Teixeira EC, Franco de Oliveira JC, Marques Novo MT, Bertolini MC (2008) The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. Microbiol 154:402-412
- Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones JB (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. Nature Reviews Microbiology 18:415–427

- Valencia-Hernandez JA, Solano-Alvarez N, Rico-Rodriguez MA, Rodriguez-Ontiveros A, Torres-Pacheco I, Rico-Garcia E, Guevara-Gonzalez R-G (2022) Eustressic dose of cadmium in soil induces defense mechanisms and protection against *Clavibacter michiganensis* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of Plant Growth Regulation 1-8
- Vidaver AK, Lambrecht PA (2004) Bacteria as plant pathogens. The Plant Health Instructor.
- Wan Y, Liu J, Mai Y, Hong Y, Jia Z, Tian G, Liu Y, Liang H, Liu J (2024) Current advances and future trends of hormesis in disease. Non-profit journalism Aging 10:26
- Wang S, Huang B, Fan D, Agathokleous E, Guo Y, Zhu Y, Han J (2021) Hormetic responses of soil microbiota to exogenous Cd: a step toward linking community-level hormesis to ecological risk assessment. Journal of Hazardous Materials 416:125760
- Worthington RJ, Rogers SA, Huigens RW, Melander C, Ritchie DF (2012) Foliar-applied small molecule that suppresses biofilmformation and enhances control of copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper. Plant Disease 96:1638-1644
- Xhemali B, Giovanardi D, Biondi E, Stefani E (2024) Tomato and Pepper Seeds as Pathways for the Dissemination of Phytopathogenic Bacteria: A Constant Challenge for the Seed Industry and the Sustainability of Crop Production. Sustainability 16: 1808
- Yang S, Li M, Shang H, Liu Y, Li X, Jiang Z, Chen G-H, Zhang X-M (2021) Effect of sublethal Spirotetramat on host locating and parasitic behaviour of *Encarsia formosa* Gahan. Pest Management Science 78: 329-335
- Zhou F, Liang HJ, Di YL, You H, Zhou FX (2014) Stimulatory effects of sublethal doses of dimethachlon on *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 98:1364–137

CAPÍTULO 2

Copper resistance and hormetic-like response in

Xanthomonas euvesicatoria pv. *perforans*

Copper resistance and hormetic-like response in *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

**Erivaldo Laurentino da Silva¹, Maurício Rossato¹, Alice Maria Quezado-Duval²,
Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira¹**

¹University of Brasília, Department of Plant Pathology, Brasília, Federal District, Brazil

²Embrapa Vegetables, Laboratory of Plant Pathology, Gama, Federal District, Brazil

*** Correspondence:**

Erivaldo Laurentino da Silva

erivaldolaurentino2@gmail.com

Keywords: Subinhibitory-dose, copper-resistance, tomato, stimulation, bacterial spot, *Solanum lycopersicum*.

Abstract

Bacterial spot (BS) is a disease that affects tomato (*Solanum lycopersicum*) and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) is the most prevalent causal agent in Central Brazil. Copper-based products are widely used to manage this disease and copper resistance in *Xep* isolates has been detected. The *copLAB* operon is involved in this resistance and the *copA* gene has a determinant role in *Xanthomonas*. Considering the impact of BS for tomato production and the occurrence of copper resistance, it is necessary to monitor the presence of genetic determinants (*copLAB*) in bacterial populations as well as their response to different copper doses. In this study, a collection of 45 Brazilian *Xep* isolates was characterized for the presence of the *copA* gene and their

in vitro sensitivity to copper. The occurrence of a stimulus effect on bacterial growth due to subinhibitory doses of copper, the evaluation of its specificity concerning isolate and *copA* gene presence and the induction of resistance in a sensitive isolate were evaluated. Effects on biofilm production and virulence on tomato plants were determined for both resistant (R) and sensitive (S) *Xep* isolates. The *copA* gene was detected by PCR in 28.8% of the isolates which showed MIC values higher than the *copA*⁻ isolates. Two *Xep* isolates (EH 2016-08 and EH 2017-69 - *Xep*, *copA*⁺) required preconditioning to express R phenotype, and the same procedure resulted in an increase in copper MIC of EH 2020-12 (*Xep*, *copA*⁻) in an hormetic-like effect. Growth stimulation at copper concentrations below the MIC was observed for *Xep* R (EH 2017-27) and S (EH 2020-12) isolates. The effect seems to be general, neither isolate or pathovar-specific, nor related to the *copA* presence. Increase in biofilm production was observed for R and S *Xep* isolates by subinhibitory concentrations of copper, but there was no stimulatory effect on the virulence of either R or S *Xep* isolates. This is the first report of a hormetic-like effect in copper-sensitive and resistant isolates of *Xep*.

Introduction

Bacterial spot (BS) is a disease of economic relevance that affects tomato (*Solanum lycopersicum*) and peppers (*Capsicum* spp.). It is caused by three species/four variants, currently classified as *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (*Xee*), *X. vesicatoria* (*Xv*) and *X. hortorum* pv. *gardneri* (*Xhg*) (Jones et al., 2004; Barak et al., 2016; Constantin et al., 2016; Morinière et al., 2020; Osdaghi et al., 2021). All species are included in the A2 list (high risk) of quarantine pathogens, under strict control in the European Union (EPPO, 2023). In Brazil, the two most prevalent species on tomato crops are *Xhg* and *Xep*, with the latter occurring

predominantly in Goiás and Distrito Federal in Central Brazil (Araújo et al., 2017). BS is favored under high humidity and temperature conditions and is easily disseminated by water splashes containing the inoculum. The inoculum may be present in crop residues for short periods, weeds or introduced into pathogen-free areas through seeds and seedlings. Therefore, the use of healthy propagative material and preventive applications of copper-based products are important allies in disease management (Osdaghi et al., 2021).

Copper-based bactericides are widely used in BS management. Copper performs different functions within the cell by complexing with proteins, interfering in the metabolism, electron transport, protein configuration, oxidative stress response, transcriptional regulation, and cellular signaling (Sharma et al., 2019). If present in high concentrations, it can lead to the production of reactive oxygen species, causing disruption of the plasma membrane, protein denaturation, and damage to genetic material (Chillappagari et al., 2010; Yue et al., 2023). Resistance to this chemical was first detected in *X. vesicatoria* by Marco and Stall (1983) and later in *Pseudomonas* and other *Xanthomonas* species as well (Griffin et al., 2017, Behlau et al., 2020). The *copLAB* operon is involved in the resistance to copper and is horizontally transferred in *Xanthomonas* spp. (Behlau et al., 2013, 2017, 2020). Bibi et al (2023) characterized a non-plasmid borne copper resistance genomic island which was located within the chromosome of several *Xep* strains. Genes in the island were associated with mobility, phage-related genes and transposase, suggesting that these genes may present two modes of horizontal transfer. Teixeira et al. (2008) showed that the *copA* gene has a determinant role in copper resistance of *Xanthomonas citri* pv. *citri*, since the inactivation of this gene lead to copper sensitivity. In *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the *copA* gene

encodes a copper oxidase protein located in the periplasm, being more determinant for copper resistance than *copL* and *copB* genes (Hsiao et al., 2011). Copper resistance in *Xep* isolates has been detected in Brazil (Araújo et al., 2012b).

Plant pathogenic bacteria can be exposed to antibiotics at subinhibitory doses either directly or indirectly. Exposure to a subinhibitory dose can occur when the substance undergoes degradation due to a range of climatic factors or inadequate application technology, causing the sprayed product to evaporate or even reach greatly reduced doses at the target pathogen (Silva et al., 2018). This exposure may lead to a phenomenon called hormesis, which is a dose response effect when subinhibitory doses of a stressor agent leads to a positive response in the organism, while high doses lead to inhibition (Calabrese and Baldwin 2002). The effect of subinhibitory doses of antibiotics has already been observed in different bacterial genera (Drummond et al., 2003; Deng et al., 2012; Migliore et al., 2013; Li et al., 2020; Revitt-Mills and Robinson 2020; Peng et al., 2021; Mo et al., 2023). This suggests that the hormesis effect may also occur in phytopathogenic bacteria exposed to antibiotics and/or chemicals used in plant disease management, such as copper-based bactericides. Additionally, resistant and sensitive isolates may also have distinct responses to non-damaging subinhibitory doses of copper.

Considering the impact of BS for tomato production in Brazil, and the occurrence of copper resistance, it is necessary to monitor the presence of genetic determinants (*CopLAB*) in bacterial populations as well as their response to different copper doses. In this study, a collection of 45 *Xep* isolates from Brazilian tomato fields was characterized for the presence of the *copA* gene and their *in vitro* sensitivity to copper hydroxide. The occurrence of a stimulus effect on bacterial growth due to subinhibitory doses of copper was investigated, followed by an evaluation of its specificity concerning isolate and *copA*

gene presence and the induction of resistance in sensitive isolates. The effects of copper at low doses on biofilm production, and virulence on tomato plants were determined for both resistant and sensitive *Xep* isolates.

Materials and methods

Bacterial isolates

Forty-five isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) were obtained from symptomatic tomato plant samples collected at Brazilian States of Goiás (22), São Paulo (13), Minas Gerais (4), Ceará (4), Santa Catarina (1) e Paraná (1) from 2014 to 2020 and identified by multiplex PCR (Araújo et al. 2012a). Two isolates of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (*Xee*), from *Capsicum* sp., were used as copper-sensitive (89-P) and copper-resistant (96-P) controls. All isolates belong to the Vegetable Phytopathogenic Bacteria Collection of Embrapa Hortaliças, Brasília, Brazil.

Amplification of the *copA* gene by PCR

Genomic DNA extraction was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's recommendations, except that in the protein precipitation step, three rounds of centrifugation were employed instead of one time. The final DNA concentration was determined by NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer and dilutions were performed to achieve a final concentration of 25 ng/μL for subsequent use.

PCR was conducted to amplify an 870 bp region of the *copA* gene (1,872 bp), one of the genes present in the *copLAB* operon (Behlau et al., 2013). Reactions were composed by 10 μL of PCR master mix 2x (Promega), 0.2 pmol of each primer (*copAF/copAR*), 2.6 μL of ultrapure water, and 2 μL of DNA from each isolate (25 ng/μL). The amplification

reactions took place in a thermocycler (Bio Rad T100™ Thermal Cycler) with the following program: initial denaturation for 5 min at 95°C, followed by 29 cycles of 95°C/30 s, annealing at 64°C/30 s, extension at 72 °C/45 s, and a final extension at 72 °C/10 min. The amplicons were analyzed by electrophoresis at 120V on a 1% agarose gel, with 1X TBE running buffer. GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®, USA) was used for gel staining, and amplicons were visualized under ultraviolet (UV) light on a transilluminator using the LPIX system (Loccus ®, Brazil).

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of copper on bacterial growth

The MIC of copper was determined according to Marin et al. (2019), adapted for 96-well microtiter plates. In sterile microtiter plates, 200 µL of molten MMCC medium (*medium minimum complexing copper*) (Pohronezny et al., 1994) containing copper at the following concentrations: 0 (control), 150 (T1), 175 (T2), or 200 µg mL⁻¹ of Cu²⁺ (T3) were added. Copper hydroxide (Supera®, Oxiquímica Agrociência, Brazil) was used as the copper source in this study. The *Xep copA*⁻ isolates were cultured in 523 medium for 48 h at 28°C, while *copA*⁺ isolates were cultured on solid MMCC medium containing Cu²⁺ (20 µg mL⁻¹) for the same period, aiming to activate the genes involved in copper resistance (Basim et al., 2005). Using a UV-Vis Spectrophotometer (UV-1203, Shimadzu Corporation®), a bacterial suspension of each isolate at a concentration of ~10⁸ CFU mL⁻¹ in sterile distilled water (SDW) (OD_{600nm} = 0.3) was prepared (Jones et al., 2000). An aliquot of 20 µL of each suspension was deposited onto the medium in each well, followed by incubation of the microplates for 4 days at 28°C. Based on the ability to grow on the treatment (T1, T2, or T3), the isolate was classified as phenotypically sensitive (S),

tolerant (T), or resistant (R) to copper, respectively (Marin et al., 2019). *Xee copA*⁺ (96-P) e *copA*⁻ (89-P) isolates were used as controls for resistance and sensitivity, respectively.

A second experiment was conducted on solid MMCC medium in Petri dishes (80 mm x 15 mm) (copper droplet onto MMCC). Bacterial suspension was diluted in 5 mL of medium (molten state, 45°C) to a final concentration of $\sim 10^8$ CFU mL⁻¹. The inoculated medium was poured into plates and 10 μ L of a copper hydroxide solution was deposited onto the solid MMCC at four perpendicular and equidistant droplets 4 cm apart. The tested concentrations were: 100, 150, 200, 250, 300 and 500 μ g mL⁻¹ for *copA*⁻ isolates, and 150, 200, 250, 300, 500, 1000, and 1500 μ g mL⁻¹ for *copA*⁺ isolates. SDW was used as control. The MIC was determined by the lowest concentration at which the presence of an inhibitory halo (region where the medium is completely translucent and without visible growth of bacterial colonies) was detected. For this experiment, isolates were considered resistant (R) when doses of 300 μ g mL⁻¹ did not inhibit growth, without the formation of an inhibitory halo, and therefore with an MIC greater than 300 μ g mL⁻¹.

Effect of subinhibitory doses of copper on the growth of *Xep*

The effect of subinhibitory doses of copper on bacterial growth was assessed following Migliore et al. (2013), with adaptations for microplate assays. To investigate whether the effects of subdoses were specific at species or isolate levels and related to the presence of the *copA* gene or *in vitro* resistance to copper, two isolates each of *Xep* and *Xee* were selected: EH 2020-12 (*copA*⁻) and EH 2017-27 (*copA*⁺) for *Xep*, and 89-P (*copA*⁻) and 96-P (*copA*⁺) for *Xee*.

In microtiter plates, 100 μ L of liquid MMCC medium were combined with 50 μ L of bacterial suspension at 4×10^8 CFU mL⁻¹ followed by the addition of 50 μ L of copper

hydroxide stock solution to each well resulting in a final concentration of $\sim 10^8$ CFU mL⁻¹. For *copA*⁻ isolates, the final copper concentrations were: 0.0; 0.2 0.4; 0.8; 1.6; 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and for *copA*⁺ isolates were: 0.0; 0.24; 0.48; 0.97; 1.95; 3.9; 7.8; 15.6; 31.25; 62.5; 125 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Two additional controls were included: wells containing only medium, and medium + copper hydroxide at 200 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for sensitive and resistant isolates, respectively. Bacterial growth (600nm) was quantified under agitation at 282 rpm, for 48h at 28°C, using an Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc., USA). Hourly absorbance readings were used to calculate the Area Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) using Microsoft Excel® 2023 to calculate the area by the formula Shaner and Finney (1977) from OD values:

$$AUBGC = \sum \left[\frac{(OD_i + OD_{i+1})}{2} \right] \times (H_{i+1} - H_i)$$

In the formula: OD_i is the optical density at hour i from a number i of hours; OD_{i+1} is the optical density at hour $i+1$; H_i is the first hour, H_{i+1} is the second hour.

The experiments, conducted in a completely randomized design (CRD) with eight wells (replicates) per combination, were repeated twice. The obtained data were subjected to ANOVA and Dunnett's test at a 95% confidence level using R software (RStudio 2020).

Effects of copper preconditioning on bacterial growth and induction of resistance in *Xep*

In this experiment, two methodologies were applied: (1) copper solution droplets on solid MMCC in plates, and (2) copper added to medium in microplate wells. In both experiments, the copper source used was copper hydroxide.

(1) Two *Xep* isolates, EH 2017-69 and EH 2016-08, which were PCR positive for *copA* (*copA*⁺), but did not exhibit the resistance phenotype *in vitro*, were cultured in MMCC amended with 20 µg mL⁻¹ of copper for 24 h to activate the resistance gene (Marin et al., 2019; Batista et al., 2021). To verify if the observed effect was isolate-specific, EH 2020-12 (*copA*⁻) was also preconditioned. Subsequently, isolates were exposed to copper at 100, 150, 200, 250, and 300 µg mL⁻¹ to assess, by the formation or absence of inhibitory halos, changes in MIC or whether preconditioning could lead to expression of resistance.

(2) A second assay was conducted in microplates to compare 48 h- growth curves between isolates EH 2020-12 (*copA*⁻, sensitive) and EH 2017-27 (*copA*⁺, resistant). All steps, experimental conditions, and treatments followed those described in the "Effect of subinhibitory doses of copper on the growth of *Xep*" section, for S and R isolates. Two groups were formed, copper-preconditioned (P) and non-preconditioned (NP) isolates, spatially separated, each occupying half of the same microplate. Means of the hourly readings observed in four wells per combination of copper concentration/isolate were used to generate growth curves and calculate the AUBGCs. Each group was compared to its own control. The experiment was independently repeated twice. The data were subjected to ANOVA and Dunnett's test at 95% confidence level.

Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on *Xep* biofilm formation

The effect of subinhibitory doses on biofilm formation by copper-resistant (EH 2017-27, *copA*⁺) and sensitive (EH 2020-12, *copA*⁻) isolates was determined according to Li and Wang (2014). Procedures for inoculum preparation, medium composition, copper concentrations, controls, and number of replicates were as described in the "Effect of subinhibitory doses of copper on the growth of *Xep*" section. After the bacterial inoculation into the microplate wells, they were maintained under static conditions at

28°C for 48 h. Planktonic growth was quantified by OD (600 nm) measurements using a microplate reader Epoch. Biofilm formation was quantified after removing the bacterial growth using a micropipette and allowed to dry under laminar flow hood for 5 minutes. Wells were then washed twice with 260 µL of SDW for 5 minutes, followed by drying and addition of 260 µL of 0.1% crystal violet (CV). After 30 minutes, the excess CV was removed, and the wells were washed twice with SDW, gently pipetted to remove free CV, and dried in an inverted position under laminar flow hood for 2 hours. The elution of bound CV was achieved by adding 260 µL of 95% ethanol to each well. Microplates were kept at room temperature for 30 minutes, and absorbance was measured at 590 nm. The mean absorbance of 8 wells was compared to the control. Absorbance readings underwent ANOVA and Dunnett's test at a 95% confidence level using R software (RStudio 2020) and experiments repeated once.

Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on bacterial spot severity in tomato plants

The experiment was conducted in a greenhouse at Embrapa Hortaliças, under automatic ventilation/cooling and humidification systems (10 mm/10 seconds/h), with a temperature range of 20-30°C. Six week-old tomato plantlets cv. Santa Cruz Kada Gigante (Feltrin Sementes[®], Brazil) with four fully formed leaves were transplanted to 2.5 L plastic pots containing a mixture of clay, sand, rice straw, and commercial substrate in proportions of 3:1:1:1, supplemented with mineral fertilization according to the crop's recommendations.

Copper hydroxide (HC) solutions were prepared in water at the commercial dose (Supera[®] – 4mL L⁻¹), and at 25 µg mL⁻¹ (subinhibitory dose with growth stimulatory effect). With a pre-compression sprayer (Guarany[®], 1L) at a working pressure of

approximately 3.0 bar (43.5 psi), each solution was applied to the adaxial surface of the leaflets until runoff. After drying, the leaflets were inoculated with *Xep* (two isolates were used separately at each experiment: EH 2020-12 (S) and EH 2027-17 (R) at $\sim 5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) using a 200 mL-manual portable sprayer. Non-inoculated plants sprayed with water (not included in the statistical analysis), and *Xep*-inoculated plants were included as controls. The plants were subject to a misting intermittent system until the disease severity evaluation date (five days after inoculation). For this, each leaflet was individually assessed using a diagrammatic scale (Duan et al., 2015). Means of severity in leaflets of 16 plants/treatment divided in four blocks were used (mean of the block = 4 leaflets/leaf x 2 leaves/plant x 4 plants). Experiments were repeated once for both isolates and the obtained data were subjected to ANOVA and T-Test at 95% confidence level, and a combined analysis was performed using AgroEstat® 1.1.0.712 2014 (Barbosa, Maldonado Junior, 2015).

Results

Amplification of the *copA* gene by PCR

An expected band of ~870 bp was observed as expected in 13 out of 45 *Xep* isolates, as well as in the *Xee* copper-resistant isolate (96-P), the positive control, what indicates the amplification of the *copA* gene region (**Supplementary Figure 1**).

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of copper for *Xep*

The MICs of copper determined for each isolate are shown in **Supplementary Table 1**. Except for EH 2017-36 (MIC = 500 µg mL⁻¹), it was observed that all *Xep copA*⁺ isolates (and *Xee* 89-P) exhibited a sensitive phenotype with MICs equal to or less than 300 µg mL⁻¹ (copper droplet onto MMCC) and 150 µg mL⁻¹ (copper added to MMCC). On the

other hand, the *copA*⁺ isolates EH 2017-69 and EH 2016-08 showed a sensitive phenotype with MICs of 150 µg mL⁻¹, when copper droplets were applied to the medium. With the method of copper diffusion in medium, five (EH 2016-08, EH 2017-24, EH 2017-69, EH 2019-103 and EH 2019-108) out of the 13 *Xep copA*⁺ isolates and the isolate *Xee* (96-P), did not exhibit a resistant phenotype (growth at 200 µg mL⁻¹) even after the preconditioning to activate R genes.

Effect of subinhibitory doses of copper on the bacterial growth of *Xep*

All four *Xep* and *Xee* isolates (*copA*⁻, S or *copA*⁺, R) exhibited hormetic-like responses when growing in liquid medium amended with copper (**Tables 1 and 2**). This response was observed when bacterial growth in copper-containing medium was higher than that observed in the control, as expressed by the Area Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC). In these concentration intervals, the AUBGCs showed statistically significant higher percentages of stimulation compared to the controls (Table 1). The experiment was repeated with similar results. While for EH 2020-12 (*Xep*, *copA*⁻, S) the stimulatory range was 0.2 – 100 µg mL⁻¹, for 89-P (*Xee*, *copA*⁻, S) this range was restricted from 0.2 to 25 µg mL⁻¹. For *Xep* EH 2020-12, the higher OD₆₀₀ values generated distinct growth curves with maximum stimulation values achieved consistently at concentrations of 25 and 50 µg mL⁻¹ among experiment repetitions (Figure 1).

Table 1 Growth stimulation in copper-sensitive *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (EH 2020-12) and *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (89-P) and under different doses of copper (source: copper hydroxide), determined by the values of the Area Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) after 48 hours of exposure in liquid MMCC.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Xee</i> 89-P		<i>Xep</i> EH 2020-12	
	AUBGC	Stimulus (%) ⁺	AUBGC	Stimulus (%)
Negative control	0,000 *	-	0,000 *	-
200	0,0000 *	-	0,0000 *	-
100	0,0000 *	-	38,473 *	76
50	0,0000 *	-	39,772 *	84
25	14,501 *	50	37,794 *	77
12.5	13,591 *	40	38,106 *	76
6.25	13,627 *	41	36,224 *	68
3.12	13,078 *	35	31,747 *	47
1.6	13,314 *	37	29,415 *	36
0.8	13,131 *	36	27,913 *	29
0.4	12,967 *	34	27,123 *	26
0.2	12,476 *	29	27,727 *	29
Positive control	9,684	-	21,568	-

⁺ Growth stimulation (%) compared to the positive control.

* Different from the control in the same column by Dunnett's test at 95% confidence. Positive control: medium + bacteria; Negative control: culture medium only.

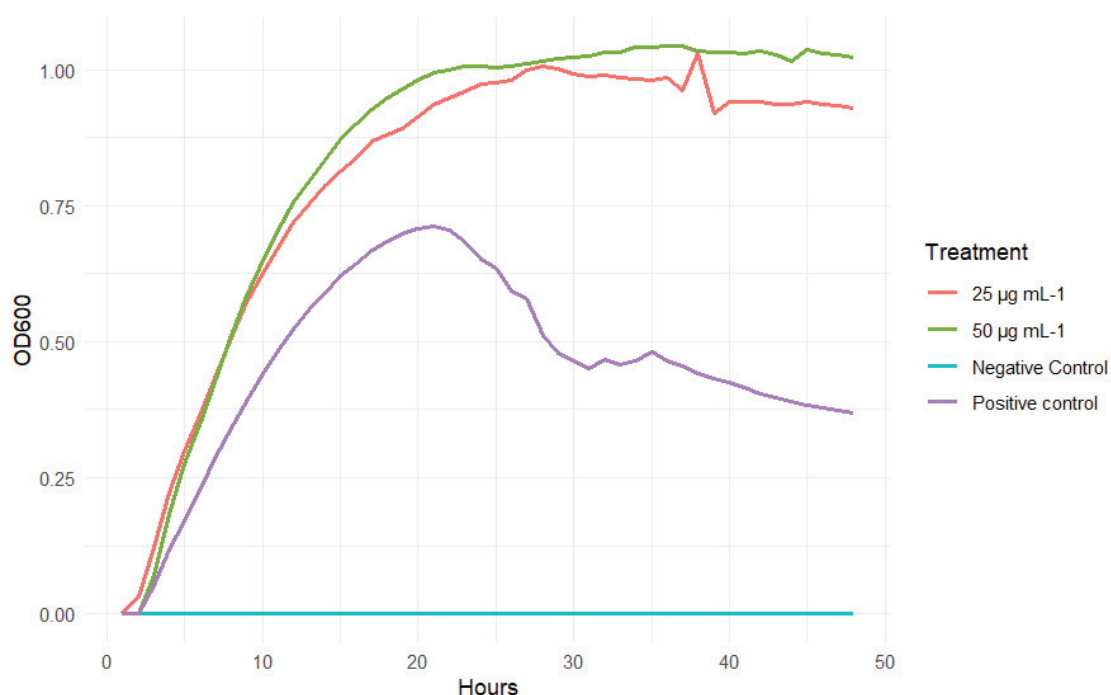


Figure 1 *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* isolate EH 2020-12 (S) 48 hour-growth curve in liquid MMCC amended with copper at two subinhibitory concentrations: Positive control: bacterial growth on MMCC without copper, Negative control: MMCC only.

For EH 2017-27 (*Xep copA*⁺, R) and 96-P (*Xee copA*⁺, R), the stimulation ranges due to copper exposure at subinhibitory doses were different, varying from 0.24 - 62.5 µg mL⁻¹ (EH 2017-27) and 0.24 - 31.25 µg mL⁻¹ (96-P), with concentrations of 62.5 and 125 µg mL⁻¹ corresponding, respectively, to non-significant stimulation and inhibition for 96-P. Results of one experiment is shown in Table 2. Among the repetitions of the experiment with isolate EH 2017-27, concentrations of 7.8 and 15.6 µg mL⁻¹ resulted in growth stimulation of 31%, respectively, with AUGC of 38,110 and 38,172, while copper at 31.25 µg mL⁻¹ resulted in stimulation up to 32% (AUGC = 38,613) compared to the control (AUBGC = 29,201) (Figure 2). Meanwhile, for 96-P, the highest stimulation was 30% at 0.24; 1.95 and 31.25 µg mL⁻¹ compared to the control.

Table 2 Growth stimulation in copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (EH 2017-27) *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (96-P) and under different doses of copper (source: copper hydroxide), determined by the values of the Area Under the Bacterial Growth Curve (AUGC) after 48 hours of exposure in liquid MMCC.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Xee</i> 96-P		<i>Xep</i> EH 2017-27	
	AUBGC	Stimulus (%) ⁺	AUBGC	Stimulus (%)
Negative control	0,000 *	-	0,000 *	-
250	0,000 *	0	11,515 *	-61
125	10,652 *	-22	25,647 *	-12
62.5	14,657	8	34,675 *	19
31.25	17,595 *	30	38,613 *	32
15.6	16,074 *	18	38,172 *	31
7.8	16,589 *	22	38,110 *	31
3.9	17,782 *	31	36,837 *	26
1.95	17,628 *	30	38,096 *	30
0.97	16,851 *	24	36,195 *	24
0.48	16,946 *	25	37,681 *	29
0.24	17,681 *	30	34,437 *	18
Positive control	13,587	-	29,201	-

⁺ Growth stimulation (%) compared to the positive control.

* Different from the control in the same column by Dunnett's test at 95% confidence. Positive control: medium + bacteria; Negative control: culture medium only.

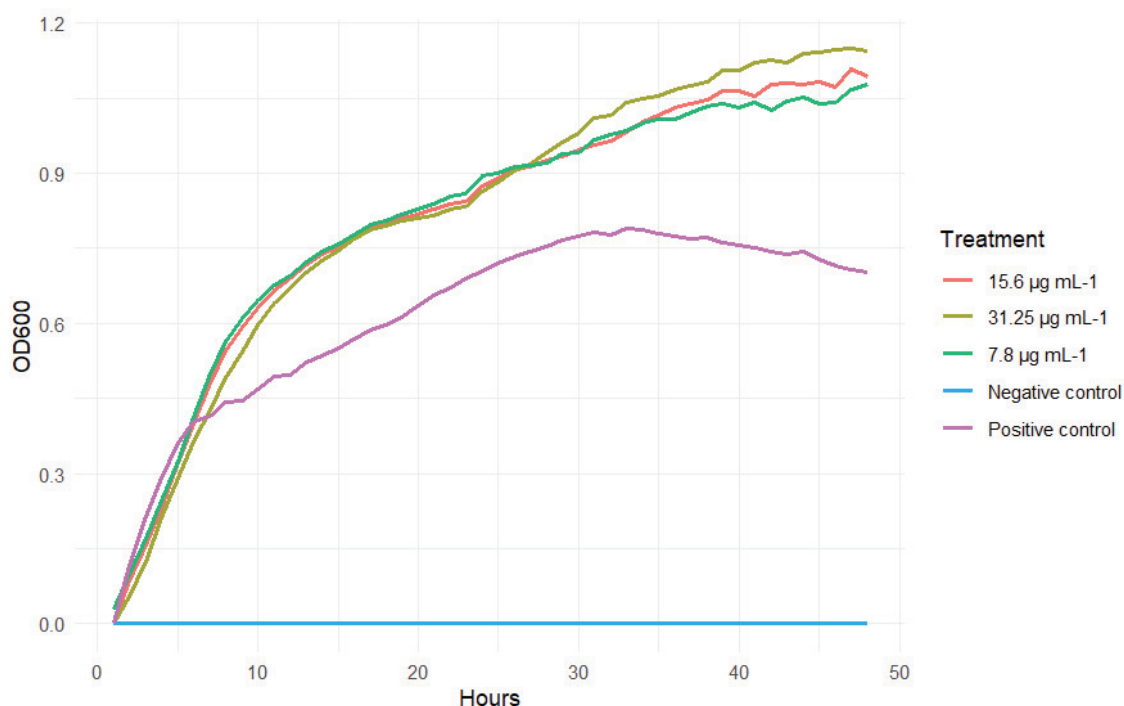


Figure 2 *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* isolate EH 2017-27 (R) 48h-growth curve in liquid MMCC amended with subinhibitory copper of concentrations. Positive control: bacterial growth on MMCC without copper; Negative control: MMCC only.

Effects of copper preconditioning on bacterial growth and induction of resistance in *Xep*

Copper droplet on solid MMCC assay

For isolates EH 2016-08 and EH 2017-69, both *copA*⁺ that did not express an R phenotype (**Supplementary Table 1**), the preconditioning to copper at 20 µg mL⁻¹ increased the resistance of the isolates. For EH 2016-08, an inhibitory halo was visible with 300 µg mL⁻¹, while for EH 2017-69, halo was not observed with this concentration inducing the isolate to express its resistance to copper. The preconditioning of isolate EH 2020-12 (*Xep*, *copA*⁻) also increased resistance to copper raising its initial MIC from 200 to 300 µg mL⁻¹ (**Figure 3**). Concentrations lower than this value reduced bacterial density at the

droplet deposition site, forming an opaque area (dark arrows) distinct from a perfect halo. On the other hand, inhibitory halos in the drop deposition site appeared translucent and without bacterial growth (white arrows) (Figure 4).

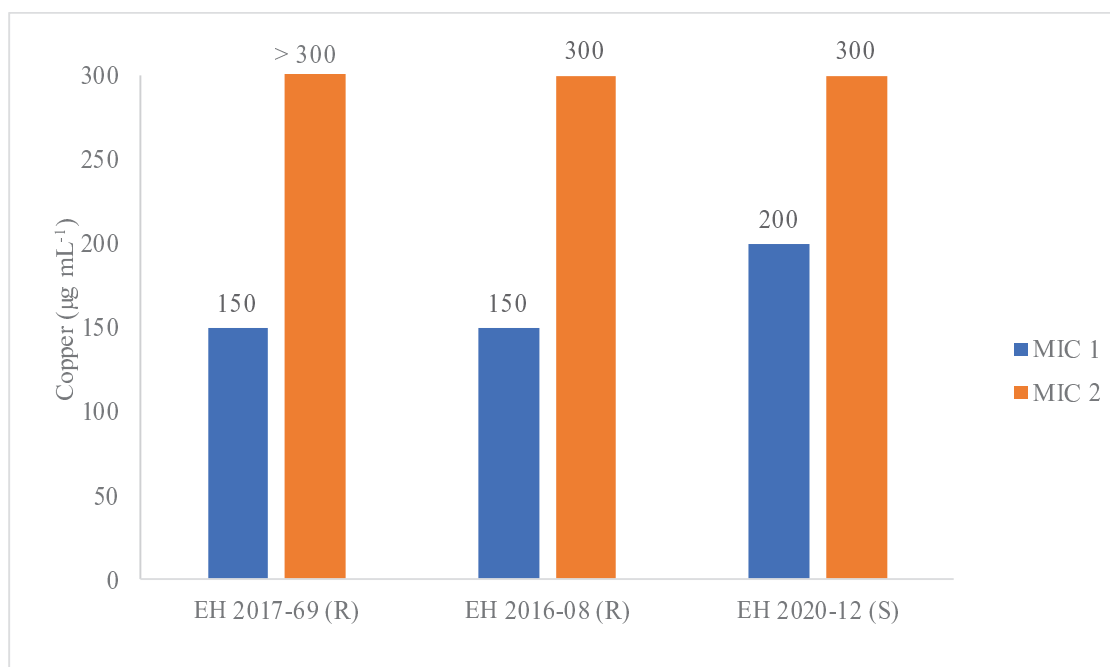


Figure 3 Determination of the minimum inhibitory concentration of copper hydroxide (source: copper hydroxide) in solid MMCC (*medium minimum complexing copper*), before (MIC 1) and after preconditioning (MIC 2) with copper (20 µg mL⁻¹) for three isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. R= resistant, S= sensitive. For EH 2017-69 growth was observed at all concentrations tested after preconditioning up to 300 µg mL⁻¹, thus MIC 2 is higher than this concentration, being classified as phenotypically resistant in this study.

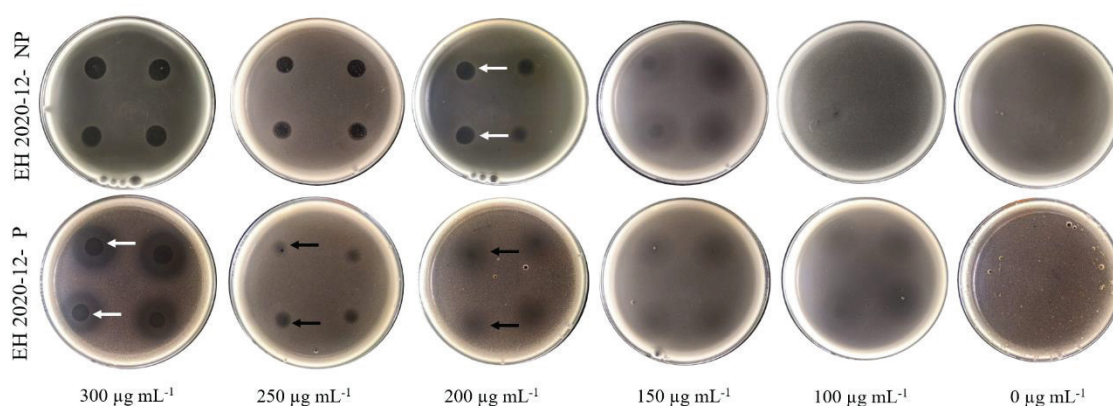


Figure 4 Determination of the minimum inhibitory concentration by applying different concentrations of copper hydroxide (copper in metallic equivalent $\mu\text{g mL}^{-1}$) directly applied as drops onto MMCC medium containing isolate EH 2020-12 (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans copA*⁻, S). P: isolate preconditioned to copper at $20 \mu\text{g mL}^{-1}/24\text{h}$, NP: non-preconditioned isolate (control), White arrows: indicate translucent region with absence of bacterial growth (inhibitory halo), Dark arrows: indicate opaque region showing reduction of bacterial density at the copper deposition site, but without formation of a perfect inhibitory halo.

Microplate assay

Once the sensitive isolate EH 2020-12 responded to the preconditioning treatment by altering its tolerance to copper (Figure 3) the isolate was grown in MMCC liquid for 48 hours and the growth curve obtained to better understand the influence of preconditioning with low doses. The different concentrations of copper applied led to reproducible results between experiments for both preconditioned (P) and non-preconditioned (NP) treatments of isolate EH 2020-12 (S). Overall, previously applied copper exhibited three effects on both P and NP isolates: inhibitory ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), growth reduction ($100 \mu\text{g}$

mL⁻¹) and an hormetic-like ($\leq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$), expressed by higher or lower AUBGC compared to the control of each isolate.

Both P and NP treatments of isolate EH 2020-12 (S) showed a stimulatory interval of doses from 0.2 to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with the maximum value of AUBCG corresponding to a stimulus of 63% significantly compared to their controls (**Table 3**). Although the initial inoculum was the same for both isolates ($\text{OD}_{600} = 0,3$), the ability to grow in medium with copper was affected by the preconditioning, since the final AUBGCs observed were significantly higher for the P isolate than the NP and this pattern was consistent among the experiment's repetitions in the same conditions (**Supplementary Tables 2 and 3**).

Table 3 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the isolate EH 2020-12 (S) (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) preconditioned (P) and non-preconditioned (NP) with copper (20 µg mL⁻¹) and exposed to different subinhibitory doses of the agent afterwards.

Copper (µg mL ⁻¹)	Preconditioned		Non-preconditioned	
	AUBGC	Stimulus (%) ⁺	AUBGC	Stimulus (%)
Negative Control	0,000 *		0,000 *	
200	0,000 *		0,000 *	
100	9,584 *	-25	5,352 *	-47
50	14,405	13	14,402 *	43
25	19,831 *	56	16,394 *	63
12.5	20,671 *	63	15,737 *	56
6.25	19,876 *	56	15,736 *	56
3.12	19,250 *	51	14,919 *	48
1.6	19,378 *	58	14,849 *	47
0.8	18,246 *	43	14,663 *	45
0.4	18,151 *	43	15,426 _a	53
0.2	16,870 *	33	15,096 *	50
Positive Control	12,720	-	10,082	-

⁺ Growth stimulation (%) compared to the positive control in the same column after 48h.

* Different from the control in the same column by Dunnett's test at 95% confidence. Positive control: medium + bacteria; Negative control: culture medium only.

The experiment was repeated with the resistant isolate EH 2017-27 to verify the effect of the preconditioning on its growth curve under several subinhibitory copper doses. The P isolate showed a higher growth in liquid medium containing low doses of copper (expressed by the AUGC) than the NP isolate. The maximum AUBGC's value was found for copper at 3.9 and 1.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ representing, respectively, 23 and 24% of stimulus in the growth compared to the control of each experiment (**Table 4**). On the other hand, for the NP treatment only the inhibitory doses (125 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were statistically different from the control and the observed stimulus were not consistent among the experiment's repetitions (**Supplementary Tables 4 and 5**).

Table 4 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the isolate EH 2017-27 (R) (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) preconditioned (P) and non-preconditioned (NP) with copper (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and after exposed to different subinhibitory doses of the agent in one independent experiment involving P and NP.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Preconditioned		Non-preconditioned	
	AUBGC	Stimulus (%) ⁺	AUBGC	Stimulus (%)
Negative control	0,000 *	-	0,000 *	-
250	19,329 *	-48	22,366 *	-45
125	28,081 *	-24	35,537 *	-12
62.5	39,193	6	42,605	6
31.25	40,669	10	42,605	6
15.6	41,283 *	12	42,879	6
7.8	42,843 *	16	43,435	8
3.9	45,402 *	23	43,694	8
1.95	45,650 *	24	41,424	3
0.97	41,671 *	13	44,183	10
0.48	36,583 *	-1	44,034	9
0.24	35,384 *	-4	39,263	-3
Positive control	36,825	-	40,328	-

⁺ Growth stimulation (%) compared to the positive control in the same column after 48hrs. Negative values correspond to inhibition.

* Different from the control in the same column by Dunnett's test at 95% confidence. Positive control: medium + bacteria; Negative control: culture medium only.

Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on *Xep* biofilm formation

Both copper-resistant EH 2017-27 (R) and sensitive EH 2020-12 (S) isolates showed stimulus on the biofilm production with reproducible results (respectively, **Table 5** and **6**). For the R isolate consistent growth stimuli reached the maximum value of 12% over the control at 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of copper, while for the S isolate, maximum stimulus's values reached 63% and 67% over the control at 25 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Table 5 Influence of different doses of copper hydroxide added to liquid MMCC on biofilm formation (BF) of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, isolate EH 2017-27 (R) after 48 hours in two independent experiments.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experiment 1			Experiment 2		
	PG ⁺	BF	BF stimulus (%) [#]	PG	BF	BF stimulus (%)
Negative control	0.000	0.000 *	-	0.000	0.000 *	-
250	0.639	1.632 *	-29	0.557	1.339 *	-45
100	0.564	1.286 *	-44	0.577	1.304 *	-47
50	0.540	1.814 *	-22	0.665	2.219 *	-9
25	0.643	2.361 *	2	0.787	2.748 *	12
12.5	0.672	2.273	-2	0.752	2.389	-2
6.25	0.697	2.230	-4	0.709	2.407	-2
3.12	0.698	2.369	2	0.716	2.177 *	-11
1.6	0.715	2.277	-2	0.696	2.311	-6
0.8	0.724	2.201	-5	0.796	2.227	-9
0.4	0.7136	2.368	2	0.860	2.406	-2
0.2	0.733	2.242	-3	0.785	2.331	-5
Positive Control	0.730	2.314	-	0.851	2.450	-

⁺ Planktonic Growth (PG) determined by optical density (OD) at 600nm after 48 h.

[#] Stimulus on biofilm formation compared to the positive control in the same column. Negative values correspond to inhibition.

* Different from the control in the same column by Dunnett's test at 95% confidence. Positive control: medium + bacteria; Negative control: culture medium only.

Table 6 Influence of different doses of copper hydroxide added to liquid MMCC on biofilm formation (BF) of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, isolate EH 2020-12 (S) after 48 hours in two independent experiments.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experiment 1			Experiment 2		
	PG ⁺	BF	BF stimulus (%) [#]	PG	BF	BF stimulus (%)
Negative control	0.000	0.000 *	-	0.000	0.000 *	-
200	0.000	0.000 *	-	0.000	0.000 *	-
100	0.186	2.044 *	39	0.197	2.564 *	67
50	0.207	2.597 *	102	0.216	2.120 *	38
25	0.203	2.346 *	60	0.377	2.502 *	63
12.5	0.280	1.793	22	0.325	1.769 *	15
6.25	0.319	1.388	-5	0.376	1.140 *	-30
3.12	0.443	1.554	6	0.625	1.366 *	-11
1.6	0.671	1.317	-10	0.735	1.273 *	-17
0.8	0.784	1.091	-26	0.762	0.841 *	-45
0.4	0.822	1.379	-6	0.789	0.872 *	-43
0.2	0.795	1.407	-4	0.784	0.923 *	-40
Positive Control	0.793	1.466	-	0.796	1.538	-

⁺ Planktonic Growth (PG) determined by optical density (OD) at 600nm after 48 h.

[#] Stimulus on biofilm formation compared to the positive control in the same column. Negative values correspond to inhibition.

* Different from the control in the same column by Dunnett's test at 95% confidence. Positive control: medium + bacteria; Negative control: culture medium only.

Effect of subinhibitory copper hydroxide doses on bacterial spot severity in tomato plants

No significant differences ($p \geq 0.05$) were found between the blocks or between the treatments within each individual experiment, nor in the combined analysis of all experiments. For all repetitions of each independent experiment conducted separately for each isolate, no treatment was effective in reducing disease severity, and neither EH 2020-12 (S) nor EH 2017-27 (R) were stimulated by the hormetic dose sprayed on tomato leaves. The labeled dose applied led to a slight reduction of the disease severity, but not significant by ANOVA test and T-Test ($p \geq 0.05$) (**Table 7**).

Table 7 Influence of copper hydroxide on the severity of Bacterial Spot caused by copper-sensitive (EH 2020-12) and resistant (EH 2017-27) isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) at five days after inoculation.

Treatment	Severity (%) *	
	EH 2017-27 (R)	EH 2020-12 (S)
Subinhibitory dose ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) ⁺	2.56 ^{ns}	1.67 ^{ns}
Commercial dose ($1,400 \mu\text{g mL}^{-1}$) [#]	1.80 ^{ns}	1.15 ^{ns}
<i>Xep</i> inoculated plants	2.72 ^{ns}	1.92 ^{ns}

⁺ Copper in metal equivalent.

[#] Commercial dose (Supera®).

*Values represent the mean obtained from 256 leaflets (= 4 leaflets/leaf x 2 leaves/plant x 4 plants x 4 blocks) divided into two experiments in a combined analysis. Means followed by the same letter in the column do not significantly differ ($p \geq 0.05$) at T-Test at 95% of confidence interval.

Discussion

The preventive application of copper-based bactericides is one of the strategies commonly employed for bacterial spot management. However, challenges of its use in tomato fields may arise due to resistance development. The presence of copper-resistant isolates of *Xanthomonas* spp. (Abbasi et al., 2015; Griffin et al., 2017; Areas et al., 2018; Marin et al., 2019; Lai et al., 2021; Rana et al., 2023), including *Xep* isolates, has already been detected in several countries including Brazil (Aguilar et al., 2000; Quezado-Duval et al., 2003; Araújo et al., 2012b). In the present study the *copA* gene was detected by PCR in 28.8% of the isolates, indicating the presence of the *copLAB* operon (Behlau et al., 2013). The importance of the *copA* gene for copper resistance was demonstrated in *X. axonopodis* pv. *citri* (Teixeira et al., 2008), where inactivation of *copA* led to sensitivity to the active ingredient. As expected, MIC values determined by two methods were lower in *copA*⁻ isolates and higher in *copA*⁺ ones. Two *Xep* isolates (EH 2016-08 and EH 2017-69) required preconditioning for 24 hours in solid MMCC amended with 20 µg mL⁻¹ copper to express a resistant phenotype. However, using the same method of preconditioning, five *copA*⁺ *Xep* isolates (EH 2016-08, EH 2017-24, EH 2017-69, EH 2019-103 and EH 2019-108) and *Xee* (96-P), were phenotypically sensitive (MIC = 150 µg mL⁻¹). Despite contrasting MIC results, employing two distinct methodologies can contribute to a better understanding of the effect of a previous subinhibitory copper exposure on resistance gene expression.

Growth stimulation at copper concentrations below the MIC was observed for both *Xep* and *Xee* isolates. According to the response obtained by different isolates, this effect induced by subinhibitory doses of copper seems to be general and not isolate or pathovar-specific. Furthermore, its occurrence is not related to the presence of the *copA*

gene or sensitivity to the chemical in *Xep* and *Xee*. The growth curves showed inhibition at higher doses (equal to or greater than the MIC), while lower doses exhibited a consistently stimulatory effect across repetitions, which suggests the occurrence of an hormetic response (Calabrese and Baldwin 2002; Garzón and Flores 2013; Silva et al., 2018; Agathokleous and Calabrese 2019). For some non-phytopathogenic bacterial species the stimulatory effect of subdoses of different antibiotics has been reported (Migliore et al., 2013; Cui et al., 2018; Sun et al., 2023). To explain this effect two mechanisms have been proposed, one is direct stimulation or induced adaptation, by a previous exposure to a lower dose of a stressor agent. A second mechanism might be overcompensation. In this case, a disruption of homeostasis occurs when an initial stress induces a chain reaction at the molecular level that can be expressed phenotypically, such as increased growth (Stebbing 1982; Davies et al., 1995; Calabrese 2008). However, these mechanisms are still poorly understood in plant bacteriology. In this study, the preconditioning of isolates R and S with subdoses of copper had different effects depending on the methodology used. Resistant isolates preconditioned in solid medium for 24 hours expressed resistance either fully (no inhibition at the highest copper concentration) or partially (isolate EH 2016-08, with copper MIC increasing from 150 to 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). This procedure of previous exposure to a lower dose of copper (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) is a standard method employed for activating resistance genes in *Xanthomonas* spp., sometimes referred to as 'pre-sensitization' or 'prior sensitization'. It aims to select resistant isolates present in a population through the phenotypic expression of genetic resistance (presence of *cop* genes) (Basim et al., 2005; Marin et al., 2019; Batista et al., 2021). It is possible that other genes in the *cop* operon may be involved in the resistance response after preconditioning, however, their role was not investigated in this study (Behlau et al., 2013; Marin et al., 2019, Behlau et al., 2020). On the other hand, the

increase in copper MIC of the sensitive isolate EH 2020-12 which lacks the *copA* gene could be explained by hormesis-like effect, since the isolate does not contain the resistance gene and was subjected to the same treatment. Whether containing resistance genes to the stressor agent or not, pre-conditioning with subinhibitory doses can increase its tolerance to the same agent (Calabrese 2016). In the literature, examples involving fungicides from different chemical groups can be found. For example, subdoses of strobilurin reduced the sensitivity of the fungus *Cryptococcus gattii* to the fungicide itself and induced cross-resistance to azole fungicides (Bastos et al., 2019). In *Botrytis cinerea*, resistance induction to different groups of fungicides occurred after pre-conditioning with subinhibitory doses of pyrrolnitrin (Ajouz et al., 2010). For antibiotics, this would also be the case of resistance induction in several bacteria after treatment with low concentrations (Revitt-Mills and Robinson, 2020). In this study, the copper concentration used to precondition the sensitive isolate was in the hormetic range. The higher growth and stimulation observed in the preconditioned isolate compared to the non-preconditioned one suggest a greater capacity for adaptation to the new environment.

In this study, an increase in biofilm production was also observed for *Xep* isolates, resistant (EH 2017-27) and sensitive (EH 2020-12), when exposed to some of the subinhibitory concentrations of copper. Stimulatory effects of low doses of antibiotics were observed in different studies involving bacteria, leading to increases in biofilm production (Hoffman et al., 2005; Linares et al., 2006; Ranieri et al., 2018). Resistant and sensitive isolates tend to form stronger and weaker biofilms, respectively (Qi et al., 2016), an increase in biofilm production can provide a competitive advantage to bacteria, as biofilm is an important virulence factor in *Xanthomonas* species (An et al., 2020).

Based on our results, no stimulatory effect on the virulence of either the resistant or sensitive *Xep* isolates was observed, and even the commercial copper dose (labeled dose) was ineffective in reducing severity under greenhouse conditions. Although the subinhibitory dose of copper used in the experiment stimulated growth, it did not affect virulence significantly. Virulence in *Xanthomonas* is controlled by a number of factors including ability to form biofilm, produce exopolysaccharides, lipopolysaccharides, adhesins, and extracellular degrading enzymes, secretion systems, effectors, and an efficient regulatory network that coordinates all these factors (An et al., 2020). It is known that, in a hormetic scenario, the growth, virulence and stressor agent doses are not necessarily related in a linear or straightforward manner. The same dose can simultaneously stimulate both the pathogen growth and virulence (Di et al., 2016b) but this was not observed in the present study. On the other hand, a dose that inhibits growth might have a stimulatory effect on virulence, as reported in studies involving the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Di et al., 2016a; Lu et al., 2018). One reason for this is that when a pesticide is applied to plants, the agent molecule can be affected by weather factors (temperature, water, humidity) (Azevedo and Chasin, 2003), the pressure of the spraying equipment, and droplet size. These factors can alter the final dose on the leaf, resulting in a lower dose (Silva et al., 2018; Garzón and Flores, 2013). Exposure to subinhibitory concentrations of different compounds can lead to various effects in bacteria, such as population growth (Migliore et al., 2013), production of cell-protective compounds that reduce reactive oxygen species (Mo et al., 2023), synthesis of secondary metabolites (Peng et al., 2021), increases in mutation rate (Revitt-Mills and Robinson, 2020), conjugation (Li et al., 2020), and increased cross-resistance tolerance levels between antibiotics (Martins et al., 2020).

To our knowledge this is the first report of a hormetic-like effect in copper-sensitive and resistant isolates of *Xep*. This effect led to a stimulation of growth and biofilm production induced by copper at subinhibitory doses. However, the stimulatory subdose was not capable of interfering with bacterial virulence in tomato plants. The mechanisms involved in stimulating *Xep* growth when exposed to low doses of copper can be explored in future studies aiming to understand how hormesis can affect the bacterial spot pathosystem and how subinhibitory doses can influence copper resistance dynamics and disease management in the field.

References

Abbasi, P. A., Khabbaz, S. E., Weselowski, B. and Zhang, L. (2015) Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. *Can J Microbiol.* 61, 753-61. doi: 10.1139/cjm-2015-0228

Agathokleous, E. and Calabrese, E. J. (2019). Hormesis can enhance agricultural sustainability in a changing world. *Glob Foo Secur.* 20, 150-155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.02.005>

Aguiar, L. A., Kimura, O., Castilho, A. M. C., Castilho, K. S. C., Ribeiro, R. L. D., Akiba, F. et al. (2000). Copper resistance in Brazilian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* of pepper and tomato. *Agronomia.* 34, 78-82. doi: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160413>

Ajouz, S., Decognet, V., Nicot, P. C. and Bardin, M. (2010). Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. *Fungal Biol.* 114, 949-954. doi: 10.1016/j.funbio.2010.09.004

An, S-Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F-J., He, Y-Q., Becker, A., et al. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol.* 44, 1–32. doi: 10.1093/femsre/fuz024

Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M. (2017). Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathol.* 66, 159-168. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12543>

Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V. and Quezado-Duval, A. M. (2012a). Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1479–1490. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05431.x

Araújo, E. R., Pereira, R. C., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M. and Café-Filho, A. C. (2012b). Sensitivity of *Xanthomonads* causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and *in vivo* infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Plant Pathol. J.* 94, 79-87. doi:10.4454/jpp.fa.2012.004

Areas, M. S., Gonçalves, R. M., Soman, J. M., Souza Filho, R. C., Gioria, R., Da Silva Junior, T. A. F., et al. (2018). Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90, 2375–2380. doi: 10.1590/0001-3765201720160413

Azevedo, F.A., Chasin, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo. InterTox. 2003. 322p.

Barak, J. D., Vancheva, T., Lefeuvre, P., Jones, J. B., Timilsina, S., Minsavage, G. V. et al. (2016). Whole-Genome Sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Clarify Taxonomy and Reveal a Stepwise Erosion of Type 3 Effectors. *Front Plant Sci.* 7,1805. doi: 10.3389/fpls.2016.01805

Barbosa, J. C., Maldonado Junior, W. (2015). AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. *FCAV/UNESP*. p.396

Basim, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Wang, J. F., Shanker, S. and Jones, J. B. (2005). Characterization of a unique chromosomal copper resistance gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8284-91. doi: 10.1128/AEM.71.12.8284-8291.2005

Bastos, R. W., Freitas, G. J. C., Carneiro, H. C. S., Oliveira, L. V. N., Gouveia-Eufrazio, L., Santos, A. P. N., et al. (2019). From the environment to the host: How non-azole agrochemical exposure affects the antifungal susceptibility and virulence of *Cryptococcus gattii*. *Sci. Total Environ.* 681, 516-523. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.094

Batista, J. N. G., Ferreira, M. A. S. V. and Quezado-Duval, A. M. (2021). Molecular and phenotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot in Brassica crops in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 46, 684-701. doi: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00456-y>

Behlau, F., Hong, J. C., Jones, J. B. and Graham, J. H. (2013). Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus associated xanthomonads. *Phytopathology*. 103, 409-418. doi: 10.1094/PHYTO-06-12-0134-R

Behlau, F., Gochez, A. M. and Jones, J. B. (2020). Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Trop. Plant Pathol.* 45, 200–212. doi:10.1007/s40858-020-00340-1

Behlau, F., Gochez, A. M., Lugo, A. J., Elibox, W., Minsavage, G. V., Potnis, N., et al. (2017). Characterization of a unique copper resistance gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. *Eur J Plant Pathol.* 147, 671–681. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1035-2>

Bibi, S., Weis, K., Kaur, A., Bhandari, R., Goss, E., Jones, J. B. and Potnis, N. (2023). A Brief Evaluation of a Copper Resistance Mobile Genetic Island in the Bacterial Leaf Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Phytopathology.* 113, 1394-1398. doi: 10.1094/PHYTO-02-23-0077-SC

Calabrese, E.J. (2008). Hormesis and Medicine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66, 594-617. doi: [10.1111/j.1365-2125.2008.03243.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03243.x)

Calabrese, E.J. (2016). Preconditioning is hormesis part II: How the conditioning dose mediates protection: Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks. *Pharmacol. Res.* 110, 265–75. doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.020

Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 91–97. doi: 10.1191/0960327102ht217oa

Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O. P., Marahiel, M. A. and Miethke, M. (2010). Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 192, 2512–24. doi: 10.1128/JB.00058-10

Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., et al. (2016). Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* 65, 792–806. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>

Cui, X., Huo, M., Chen, C., Yu, Z., Zhou, C., Li, A., et al. (2018). Low concentrations of Al (III) accelerate the formation of biofilm: Multiple effects of hormesis and flocculation. *Sci Total Environ.* 634, 516-524. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.376

Davies, J. M., Lowry, C. Y. and Davies, K. J. (1995). Transient adaptation to oxidative stressing yeast. *Arch Biochem Biophys.* 317, 1-6. doi: 10.1006/abbi.1995.1128

Deng, Z., Lin, Z., Zou, X., Yao, Z., Tian, D., Wang, D. and Yin, D. (2012). Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: A case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7746–7754. doi: <https://doi.org/10.1021/es203490f>

Di, Y. L., Cong, M. L., Zhang, R. and Zhu, F. X. (2016a). Hormetic Effects of Trifloxystrobin on Aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 100, 2113-2118. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0403-RE>

Di, Y. L., Lu, X. M., Zhu, Z. Q. and Zhu, F. X. (2016b). Time course of carbendazim stimulation on pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* indicates a direct stimulation mechanism. *Plant Dis.* 100:1454–1459. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1349-RE>

Drummond, L.J., Smith, D.G.E., Poxton, I.R. (2003). Effects of sub-MIC concentrations of antibiotics on growth of and toxin production by *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 52, 1033–1038. doi: 10.1099/jmm.0.05387-0

Duan, J., Zhao, B., Wang, Y. and Yang, W. (2015). Development and validation of a standard area diagram set to aid estimation of bacterial spot severity on tomato leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 665–675. doi: 10.1007/s10658-015-0642-7

EPPO (2023). PM 7/110 (2) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *EPPO Bulletin.* 53, 558–579. Available: <https://doi.org/10.1111/epp.12960>

Garzón, C.D., Flores, F.J. (2013). Hormesis: Biphasic dose-reponse to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. In: Nita, M. (ed.) Fungicides - showcases of integrated plant disease management from around the world. Rijeka: *In Tech.* 311-328

Griffin, K., Gambley, C., Brown, P. and Li, Y. (2017). Copper-tolerance In *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. *Crop Prot.* 96, 144–150. doi: 10.1016/j.cropro.2017.02.008

Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. and Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 436, 1171-5. doi: <https://doi.org/10.1038/nature03912>

Hsiao, Y. M., Liu, Y. F., Lee, P. Y., Hsu, P. C., Tseng, S. Y. and Pan, Y. C. (2011). Functional characterization of *copA* gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9290-302. doi: 10.1021/jf2024006

Jones, J. B., Bouzar, H., Stall, R. E., Almira, E. C., Roberts, P. D., Bowen, B. W., et al. (2000). Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *IJSEM*. 50, 1211–1219. doi: 10.1099/00207713-50-3-1211

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. and Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 755–762. doi: <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>

Lai, Y-R., Lin, C-H., Chang, C-P., Ni, H-F., Tsai, W-S. and Huang, C-J. (2021). Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Plant Protect. Sci.* 57, 206–216. doi: 10.17221/160/2020-PPS

Silva, E. L., Freitas-Lopes, R. L. and Lopes, U. P. (2018). Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi and oomycetes: current status and research perspectives. *RAAP*. 26:69-80

Li. J. and Wang, N. (2014). Foliar application of biofilm formation–inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Phytopathology*. 104, 134-142

Li, X., Shi, J., Sun, H. and Lin, Z. (2020). Hormetic dose-dependent response about typical antibiotics and their mixtures on plasmid conjugative transfer of *Escherichia coli*

and its relationship with toxic effects on growth. *Sci. Total Environ.* 205, 11130. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111300

Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F. and Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci.* 103:19484-9. doi: 10.1073/pnas.0608949103

Lu, X., Zhang, R., Cong, M., Li, J. and Zhu, F. (2018). Stimulatory Effects of Flusilazole on Virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 102,197-201. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1041-RE>

Marco, G. M., and Stall, R. E. (1983). Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Dis.* 67,779- 781. doi: 10.1094/PD-67-779

Marin, T. G. S., Galvanin, A. L., Lanza, F. E. and Behlau, F. (2019). Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. *Plant Pathol.* 68, 1088-1098. doi: 10.1111/ppa.13026

Martins, D., McKay, G. A., English, A. M. and Nguyen, D. (2020). Sublethal paraquat confers multidrug tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* by inducing superoxide dismutase activity and lowering envelope permeability. *Front. Microbiol.* 11, 576708. doi: 10.3389/fmicb.2020.576708

Migliore, L., Rotini, A. and Thaller, M. C. (2013). Low doses of tetracycline trigger the *E. coli* growth: a case of hormetic response. *Dose-Response.* 11, 550-7. doi: 10.2203/dose-response.13-002.Migliore

Mo, L. Y., Wang, J., Qin, L. T., Yang, Y. L. and Liang, N. (2023). Mechanism of time-dependent toxicity of quinolone antibiotics on luminescent bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *Ecotoxicol Environ Saf.* 255, 114784. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114784

Morinière, L., Burlet, A., Rosenthal, E. R., Nesme, X., Portier, P. and Bull, C. T. (2020). Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995. *Syst. Appl. Microbiol.* 43, 126087. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126087

Osdaghi, E., Jones, J. B., Sharma, A., Goss, E. M., Abrahamian, P. and Newberry, E. A., et al. (2021). A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. *Mol. Plant Pathol.* 00, 1–20. doi: 10.1111/mpp.13125

Peng, J., Triplett, L. R. and Sundin, G. (2021). Activation of metabolic and stress responses during subtoxic expression of the type I toxin *hok* in *Erwinia amylovora*. *BMC Genomics.* 22, 74. doi: 10.1186/s12864-021-07376-w

Pohronezny, K., Sommerfeld, M. and Raid, R. (1994). Streptomycin resistance and copper tolerance among strains of *Pseudomonas cichorii* in celery seedbeds. *Plant Dis.* 78, 150-3. doi: 10.1094/PD-78-0150

Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J. et al. (2016) Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 12, 7-483. doi: 10.3389/fmicb.2016.00483

Quezado-Duval, A.M., Gazzoto Filho, A., Leite Júnior, R. P. and Camargo, L. E. A. (2003). Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Hortic. Bras.* 21, 670-675. doi: 10.1590/S0102-05362003000400020

Rana, R., Jaiswal, G., Bansal, K. and Patil, P.B. (2023). Comparative genomics reveals the emergence of copper resistance in a non-pigmented *Xanthomonas* pathogen of grapevine. *Environ Microbiol.* 6, 716-726. doi: 10.1111/1758-2229.13164

Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B. and Burrows, L.L. (2018). Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol.* 45, 164-169. doi: 10.1016/j.mib.2018.07.006

Revitt-Mills, S. A. and Robinson, A. (2020). Antibiotic-Induced Mutagenesis: Under the Microscope. *Front Microbiol.* 11, 585175. doi: 10.3389/fmicb.2020.585175

RStudio T (2020) RStudio: Integrated development for R. RStudio, PBC, Boston. MA. Available in: <http://www.rstudio.com/>. Accessed in 2024

Sharma, A., Sharma, D. and Verma, S. K. (2019). Physiological and molecular plant pathology *in silico* identification of copper-binding proteins of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* for their probable role in plant-pathogen interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 106, 187–195. doi: 10.1016/j.pmpp.2019.02.005

Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056

Stebbing, A.R. (1982). Hormesis - the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* 3, 213-234. doi: 10.1016/0048-9697(82)90066-3

Sun, H., Zhang, Y., Wang, J., Ren, L. F., Tong, D., Wang, J. and Tang, L. (2023). Time-dependent hormetic effects of polypeptide antibiotics and two antibacterial agents contribute to time-dependent cross-phenomena of their binary mixtures. *Sci. Total Environ.* 892, 164343. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164343

Teixeira, E. C., Franco de Oliveira, J. C., Marques Novo, M. T. and Bertolini, M. C. (2008). The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiol. (Reading)*. 154, 402-412. doi: 10.1099/mic.0.2007/013821-0

Yue, Y., Liu, H., Xia, H. and Chu, Z. (2023). Double- or Triple-Tiered Protection: Prospects for the Sustainable Application of Copper-Based Antimicrobial Compounds for Another Fourteen Decades. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 108933. doi: 10.3390/ijms241310893

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

ELS: Conceptualization, experimental procedures, statistical and data analysis, writing the original draft. MASVF: Project administration, supervision, manuscript review and editing. AMQD: Supervision and manuscript review. MR: Supervision and manuscript review. All authors read and approved the submitted version.

Funding

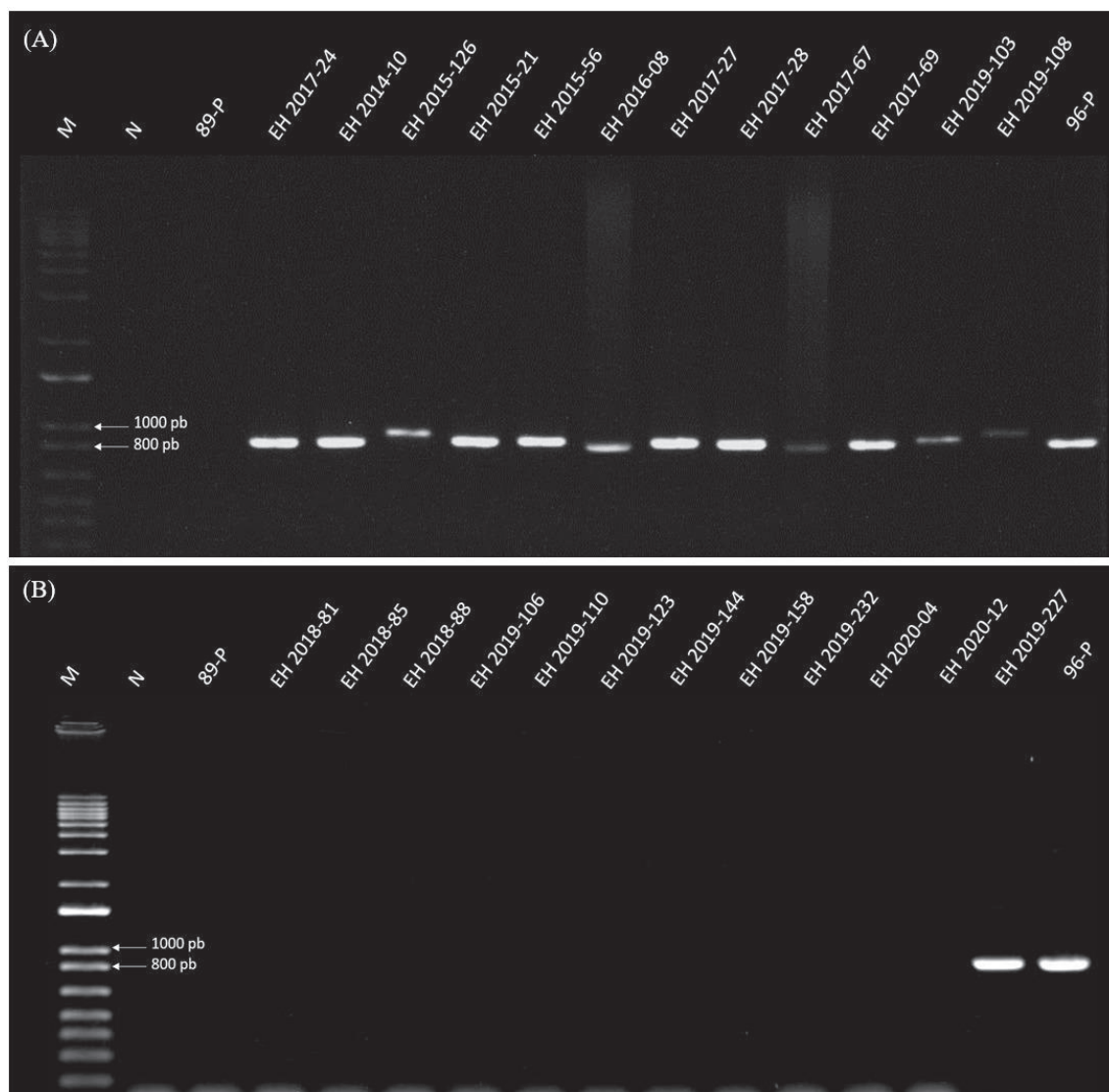
This research was supported by the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal - FAP/DF. Grant#FAPDF 00193-00001496/2021-15.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Embrapa Hortaliças for providing a doctorate scholarship to ELS.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.



Supplementary Figure 1 Presence of the amplicon corresponding to the *copA* gene (~870 bp) in 13 isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* M: 1 Kb-Plus DNA ladder molecular marker (Invitrogen); N: PCR negative control; 89-P: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, copper-sensitive and PCR negative for *copA*; 96-P: copper – resistant and PCR positive for *copA*.

Supplementary Table 1 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of copper (copper hydroxide) using two methodologies for isolates of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* PCR *copA*⁻ and *copA*⁺.

Presence of the amplicon <i>copA</i>	Isolate	MIC (µg mL ⁻¹) *	
		Copper droplet onto MMCC	Copper added to MMCC
<i>CopA</i> ⁺	EH 2014-10	1000	NH ^{**}
	EH 2015-126	1000	NH ^{**}
	EH 2015-21	NH	NH ^{**}
	EH 2015-56	NH	NH ^{**}
	EH 2016-08	150	150 ^{**}
	EH 2017-24	1000	150 ^{**}
	EH 2017-27	NH	NH ^{**}
	EH 2017-28	NH	NH ^{**}
	EH 2017-67	NH	NH ^{**}
	EH 2017-69	150	150 ^{**}
	EH 2019-103	NH	150 ^{**}
	EH 2019-108	NH	150 ^{**}
	EH 2019-227	NH	NH ^{**}
	96-P (<i>Xee</i>)	NH	150 ^{**}
<i>CopA</i> ⁻	EH 2014-17	300	150
	EH 2014-33	300	150
	EH 2015-111	250	150
	EH 2015-53	200	150

	EH 2016-03	300	150
	EH 2016-18	200	150
	EH 2016-20	150	150
	EH 2017-32	250	150
	EH 2017-36	500	150
	EH 2017-42	100	150
	EH 2017-62	300	150
	EH 2018-01	150	150
	EH 2018-04	200	150
	EH 2018-104	250	150
	EH 2018-13	200	150
	EH 2018-132	250	150
	EH 2018-139	100	150
	EH 2018-19	200	150
	EH 2018-67	250	150
	EH 2018-70	250	150
	EH 2018-78	100	150
	EH 2018-81	200	150
	EH 2018-85	150	150
	EH 2018-88	300	150
	EH 2019-106	300	150
	EH 2019-110	200	150
	EH 2019-123	250	150
	EH 2019-144	250	150

	EH 2019-158	300	150
	EH 2019-232	250	150
	EH 2020-04	300	150
	EH 2020-12	200	150
	89-P (<i>Xee</i>)	300	150

*MIC: lowest concentration at which the presence of an inhibition halo indicates that the isolate no longer grow and is sensitive. Isolates that showed a MIC > 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were considered resistant when copper applied as droplets onto MMCC. For copper added to MMCC method, isolates were phenotypically classified as sensitive (MIC = 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$), tolerant (MIC = 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$), or resistant (MIC = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to copper, respectively according to Marin et al. (2019).

** Isolates were preconditioned to copper at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, NH: no halo formed when the isolate was exposed to the highest dose, *Xee*: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (positive and negative controls for the presence of the *copA* gene).

Supplementary Table 2 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the EH 2020-12 (S) isolate (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) non-preconditioned (NP) to copper and exposed to different subinhibitory doses of the agent in two independent experiments.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experiment 1 *	Experiment 2
Negative Control	0,000 ** / -	0 / -
200	0,000 ** / -	0 / -
100	2,658 ** / -79	5,352 ** / -47
50	16,514 ** / 30	14,402 ** / 43
25	17,930 ** / 41	16,394 ** / 63
12.5	18,63 ** / 46	15,737 ** / 56
6.25	8,344 ** / 44	15,736 ** / 56
3.12	17,683 ** / 39	14,919 ** / 48
1.6	16,589 ** / 30	14,849 ** / 47
0.8	16,235 ** / 27	14,663 ** / 45
0.4	16,212 ** / 27	15,426 ** / 53
0.2	16,679 ** / 31	15,096 ** / 50
Positive Control	12,750 / -	10,082 / -

* Values observed in the experiments correspond, respectively: AUBGC / Stimulation (%) in relation to the positive control in the column. Negative stimulation values accompanying the AUBGC correspond to growth inhibition.

** Different from its positive control in the column by Dunnett's test at 95% confidence. Negative control: only medium, Positive control: medium + bacteria.

Supplementary Table 3 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the EH 2020-12 (S) isolate (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) preconditioned (P) to copper and exposed to different subinhibitory doses of the agent in two independent experiments.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experiment 1 *	Experiment 2
Negative control	0,000 ** / -	0,000 ** / -
200	0,000 ** / -	0,000 ** / -
100	7,639 ** / -51	10,372 / -5
50	20,846 ** / 33	15,077 ** / 38
25	22,278 ** / 42	19,389 ** / 78
12.5	24,978 ** / 60	21,373 ** / 96
6.25	25,404 ** / 62	20,123 ** / 85
3.12	23,292 ** / 49	18,174 ** / 67
1.6	21,800 ** / 39	17,959 ** / 65
0.8	20,338 ** / 30	16,712 ** / 53
0.4	20,120 ** / 29	17,337 ** / 59
0.2	20,182 ** / 29	16,370 ** / 50
Positive control	15,651 / -	10,905 / -

* Values observed in the experiments correspond, respectively: AUBGC / Stimulation (%) in relation to the positive control in the column. Negative stimulation values accompanying the AUBGC correspond to growth inhibition.

** Different from its positive control in the column by Dunnett's test at 95% confidence. Negative control: only medium, Positive control: medium + bacteria.

Supplementary Table 4 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the EH 2017-27 (R) isolate (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) non-preconditioned to copper and exposed to different subinhibitory doses of the agent in two independent experiments.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experiment 1 *	Experiment 2
Negative control	0,000 ** / -	0,000 ** / -
250	22,366 ** / -45	15,412 ** / -64
125	35,537 ** / -12	34,589 ** / -20
62.5	42,605 / 6	44,212 / 2
31.25	42,605 / 6	44,212 / 2
15.6	42,879 / 6	44,058 / 2
7.8	43,435 / 8	47,380 ** / 10
3.9	43,694 / 8	47,102 / 9
1.95	41,424 / 3	44,951 / 4
0.97	44,183 / 10	46,344 / 7
0.48	44,034 / 9	44,39 / 3
0.24	39,263 / -3	41,484 / -4
Positive control	36,824 / -	43,217 / -

* Values observed in the experiments correspond, respectively: AUBGC / Stimulation (%) in relation to the positive control in the column. Negative stimulation values accompanying the AUBGC correspond to growth inhibition.

** Different from its positive control in the column by Dunnett's test at 95% confidence. Negative control: only medium, Positive control: medium + bacteria.

Supplementary Table 5 Areas Under the Bacterial Growth Curve (AUBGC) and growth stimulation (%) of the EH 2017-27 (R) isolate (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*) preconditioned to copper and exposed to different subinhibitory doses of the agent in two independent experiments.

Copper ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experiment 1 *	Experiment 2
Negative control	0,000 ** / -	0,000 ** / -
250	19,329 ** / -48	13,901 ** / -66
125	28,081 ** / -24	29,818 ** / -27
62.5	39,193 / 6	44,966 / 10
31.25	40,667 / 10	46,320 ** / 13
15.6	41,283 ** / 12	48,107 ** / 17
7.8	42,843 ** / 16	48,766 ** / 19
3.9	45,402 ** / 23	46,410 ** / 13
1.95	45,650 ** / 24	46,401 ** / 13
0.97	41,671 ** / 13	45,850 ** / 12
0.48	36,583 ** / -1	41,932 / 2
0.24	35,384 ** / -4	40,089 / -2
Positive Control	36,825 / -	41,051 / -

* Values observed in the experiments correspond, respectively: AUBGC / Stimulation (%) in relation to the positive control in the column. Negative stimulation values accompanying the AUBGC correspond to growth inhibition.

** Different from its positive control in the column by Dunnett's test at 95% confidence. Negative control: only medium, Positive control: medium + bacteria.

CAPÍTULO 3

**Resposta de *Bacillus* spp. a doses de cobre e
efeitos da interação sobre o controle da mancha
bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas*
euvesicatoria pv. *perforans*)**

Resposta de *Bacillus* spp. a doses de cobre e efeitos da interação sobre o controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*)

Erivaldo Laurentino da Silva^{1,*}, Maurício Rossato¹, Alice Maria Quezado-Duval², Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira¹

¹University of Brasília, Department of Plant Pathology, Brasília, Federal District, Brazil

² Embrapa Vegetables, Laboratory of Plant Pathology, Gama, Federal District, Brazil

*** Correspondence:**

Erivaldo Laurentino da Silva
erivaldolaurentino2@gmail.com

Resumo

A mancha bacteriana do tomateiro (Mab) é uma doença de relevância econômica causada por três espécies/variantes de *Xanthomonas*, sendo *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) a mais prevalente no Brasil. *Bacillus subtilis* QST 713 (*BS*) – Serenade® e *B. amyloliquefaciens* MBI600 (*BA*) - Duravel® são agentes de controle biológico usados no manejo da Mab juntamente a bactericidas à base de cobre. Tem se observado que subdoses de antibióticos estimulam *Bacillus* em um fenômeno denominado hormese. Neste estudo, nós investigamos o efeito de subdoses de hidróxido (HC) e sulfato de cobre (SC) no crescimento *in vitro* de *BS* e *BA*, e a compatibilidade dos agentes de controle biológico com o hidróxido de cobre comercial na redução da severidade da Mab. A eficiência de *BS* e *BA* foi determinada pela aplicação foliar e no solo via “*drench*” com cobre estimulatório. *BS* e *BA* foram inibidos pelo cobre a 300 µg mL⁻¹ (SC) e, 800 µg mL⁻¹ e 1000 µg mL⁻¹ (HC), respectivamente. As taxas de crescimentos foram 95 e 26%

superiores aos controles para *BS*, respectivamente pelo cobre a $2.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SC) e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HC), e 40, 29 e 46%, respectivamente a doses de 9.3 e $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SC) e $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HC) para *BA*. Isso sugere um efeito estimulatório no crescimento induzido por doses subinibitórias de cobre em *Bacillus*. Contudo, essas doses não reduziram a severidade da Mab em condições de casa de vegetação.

Palavras-chave: *Bacillus* spp.; dose subinibitória; hidróxido de cobre; *Solanum lycopersicum*

Abstract

Tomato bacterial spot (BST) is a disease of economic relevance caused by three *Xanthomonas* species/variants, being *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*), the most prevalent in Brazil. *Bacillus subtilis* QST 713 (*BS*) – Serenade® and *B. amyloliquefaciens* MBI600 (*BA*) - Duravel® are biocontrol agents used for BST management along with copper-based bactericides. It has been shown that subdoses of antibiotics stimulate *Bacillus* in a phenomenon called hormesis. In the present study, we investigated the effect of copper hydroxide (CH) and sulphate (CS) subdoses on the *in vitro* growth of *BS* and *BA* and the compatibility of the biocontrol agents with commercial copper hydroxide to reduce severity of BST. *BS* and *BA* efficiency was determined by foliar and soil drench applications, with stimulatory doses of copper hydroxide. There was an inhibitory effect of copper for both *Bacillus* spp. at 300 µg mL⁻¹ (CS) and 800 µg mL⁻¹ and 1000 µg mL⁻¹ (CH) for *BS* and *BA*, respectively. Growth rates were 95 and 26% higher than controls for *BS* for copper at 2.3 µg mL⁻¹ (CS) and 20 µg mL⁻¹ (CH), and 40, 29 and 46%, respectively for doses of 9.3 and 0.28 µg mL⁻¹ (CS) and 1.5 µg mL⁻¹ (CH) for *BA*. This suggests, that there is a growth stimulus induced by subinhibitory doses of copper in *Bacillus*. However, these doses did not reduce the severity of BST under greenhouse conditions.

Keywords: *Bacillus* spp.; Subinhibitory dose; Copper hydroxide; *Solanum lycopersicum*

Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma importante hortaliça amplamente cultivada no Brasil e no mundo. Com uma produção 3,9 milhões de toneladas do fruto em 2023 (IBGE 2024), o Brasil é o 8º maior produtor mundial, sendo os maiores produtores China, Índia e Turquia, respectivamente (FAOSTAT 2024). Algumas regiões brasileiras, como a RIDE-DF - Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno, destacam-se na produção e cerca 74% da produção de tomate é destinada à indústria (CONAB 2021). No ano de 2022 foram comercializadas na CEASA-DF 22.335 toneladas de tomate, sendo 55,16% cultivadas no DF (CEASA 2023). Essa produção pode ser ameaçada pelos diversos desafios que a cultura enfrenta, dentre eles o controle de doenças. A mancha bacteriana do tomateiro (Mab) - é uma das principais doenças do tomateiro, cuja etiologia é complexa envolvendo três espécies de *Xanthomonas*, uma delas com dois patovares, a saber: *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (*Xee*), *X. vesicatoria* (*Xe*) e *X. hortorum* pv. *gardneri* (*Xhg*) (Osdagui et al. 2021). *Xep* é a espécie prevalente em tomateiros no Brasil, segundo levantamento realizado por Araújo et al. (2017), que incluiu áreas produtoras do DF e entorno. A bactéria não é um patógeno exclusivo do tomateiro, sendo também importante nas culturas da pimenta e pimentão (*Capsicum* spp.) (Ritchie 2000, EPPO 2023). Os danos da doença ocorrem em função dos sintomas na parte aérea e dos custos de controle, baseado no uso de produtos cúpricos e antibióticos (Quezado-Duval e Lopes 2010), sendo atualmente registrados 26 produtos, dentre cúpricos e antibióticos no Brasil (Agrofit 2024). Questões preocupantes para o manejo da doença na cultura do tomate são a capacidade de disseminação via sementes e o surgimento de isolados resistentes aos produtos cúpricos, já relatados no Brasil (Araújo et al. 2012). Tal fato pode ter

consequências diretas reduzindo a eficiência de controle da doença (Areas et al. 2018). Desse modo, o controle biológico (CB), ou a associação do controle químico e biológico, tem sido bastante discutido para o manejo da Mab (Osdaghi et al. 2021). No Brasil, estão registrados Serenade® e Duravel®, produtos à base de *Bacillus* spp., para controle de *Xanthomonas* em tomateiro (Agrofit, 2024). O gênero *Bacillus* tem demonstrado potencial como biocontrolador no controle de fitobacterioses (Choi et al. 2014, Mates et al. 2019).

Bacillus podem atuar no controle biológico pela produção de antibióticos, como bacteriocinas e lipopeptídeos cíclicos; enzimas líticas, como quitinases, quitosanases, glucanases, celulases, lipases e proteases; e sideróforos, estes produzidos por diversas espécies, incluindo *B. subtilis* e *B. amyloliquefasciens* (Miljaković et al. 2020). Na relação com *Xanthomonas*, *Bacillus* é capaz de produzir compostos bioativos, surfactantes (Monteiro et al. 2005), voláteis (Xie et al. 2018) e antibióticos (Wu et al. 2015, Rabbee, Baek 2023).

Em um estudo envolvendo as três espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana, Olishavska et al. (2023) demonstraram que a produção dos antibióticos (oxidifidina e polimixina) é o mecanismo de ação de *Bacillus* spp. como biocontrolador sobre os patógenos. A produção de lipopeptídeos produzidos por *B. velezensis* também já foi relatada na interação com *X. euvesicatoria* (Pajčin et al. 2020). Para *X. vesicatoria*, *B. subtilis* também demonstrou capacidade de induzir resistência sistêmica em tomateiro (Chandrasekaran, Chun 2016) e a produção de compostos antioxidantes (Akila et al. 2024). Logo, o uso de biocontroladores pode ser chave no controle da doença considerando seu potencial, em especial dentro de um contexto de manejo integrado.

A aplicação de um manejo integrado com a utilização simultânea de biocontroladores e pesticidas tem sido alvo de pesquisas com resultados promissores e merece maior atenção (Ibrahim et al. 2016). A utilização de doses subinibitórias de produtos químicos para aumento da eficiência da ação de um microrganismo, no caso uma levedura, já foi demonstrado e é o estudo que dá base ao princípio hormético (Schulz 1888, Duke et al. 2017). A hormese consiste em uma resposta bifásica, onde baixas doses de um composto têm efeito estimulatório enquanto doses elevadas apresentam efeito inibitório (Calabrese e Baldwin 2002). Já foi demonstrado que *B. subtilis* pode apresentar resposta hormética à subdoses de antibióticos (Liu et al. 2018). A importância da cultura do tomateiro no cenário mundial faz do manejo da Mab uma prioridade sendo *Xep* o principal alvo dos estudos envolvendo a doença, por sua prevalência no Brasil. O potencial de *Bacillus* spp. no controle biológico e sua capacidade de responder a doses estimulatórias merecem ser investigadas no que diz respeito às interações possíveis entre o cobre em doses subinibitórias e o biocontrolador. No presente estudo, a ocorrência do efeito estimulatório em *Bacillus subtilis* QST 713 – Serenade® e *B. amyloliquefaciens* MBI600 - Duravel® induzido por doses subinibitórias de cobre *in vitro*, a eficiência dos biocontroladores e compatibilidade com o cobre comercial no manejo da Mab pela aplicação via foliar, eficiência do controle biológico exercido por *B. subtilis* QST 713 – Serenade® em aplicações via “soil drench” e sua otimização por doses estimulatórias de cobre foram investigados.

Materiais e métodos

Obtenção de isolados

Neste estudo, dois isolados obtidos de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. (*Bacillus subtilis* QST 713 – Serenade® e *B. amyloliquefaciens* MBI600 - Duravel®)

foram utilizados. Isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett 1970) a 28°C/24 horas e transferidos em tubos contendo 10 mL de água destilada esterilizada. Tubos foram vedados, identificados e armazenados a temperatura ambiente para preservação e uso neste estudo (Mariano e Souza 2016).

Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de cobre sobre *Bacillus* spp.

Suspensões de *Bacillus subtilis* QST 713 e *B. amyloliquefaciens* MBI600 foram preparadas em ADE (água destilada estéril) a partir de colônias de 24h para uso nas etapas posteriores. Neste experimento, meio MMCC (*medium minimum complexing copper*) foi utilizado para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) devido à baixa capacidade de complexação de íons de cobre (Cu^{+2}) (Pohronezny et al. 1994). Em espectrofotômetro (UV-Vis Spectrophotometer UV-1203, Shimadzu collaboration®) foi determinada uma alíquota da suspensão que adicionada ao meio fornecesse uma concentração de $\sim 10^4$ UFC mL^{-1} ($\text{OD}_{600} = 0,25$) e volume da suspensão foi corrigido para 5 mL de meio/placa e a suspensão adicionada ao MMCC fundente (45°C). Com auxílio de uma pipeta, o meio contendo o inóculo foi transferido para placas de Petri (80mm x 15mm). Dez μL de solução sulfato de cobre (SC) ou hidróxido de cobre (HC) como fontes de Cu^{+2} foram depositados sobre o meio em 4 pontos equidistantes 4 cm entre si. Para SC, após testes prévios, 10 concentrações foram utilizadas: C1- 1500 (concentração comercial do cobre), C2- 600, C3 - 300, C4 - 250, C5 - 200, C6 - 150, C7 - 100, C8 - 50 e C9 - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto para HC sete concentrações de cobre foram empregadas: C1 - 2000, C2 - 1000, C3 - 800, C4 - 600, C5 - 400, C6 - 200, C7 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (em equivalente metálico do produto comercial). Como controle foi utilizado apenas água sobre o meio de cultura. Placas foram seladas com plástico filme e incubadas por 24h a 28°C. Neste

estudo, a CMI foi determinada como a concentração onde o crescimento bacteriano é inibido, caracterizado pela formação de um halo inibitório (caráter qualitativo). Foi definido como halo ou zona de inibição a área a partir do ponto de aplicação da solução de cobre em que não houve crescimento bacteriano. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições para cada combinação dose /isolado. Todos os tratamentos foram repetidos pelo menos uma vez.

Efeitos de doses subinibitórias no crescimento de *Bacillus* spp.

Os efeitos de concentrações subinibitórias de cobre (abaixo da CMI) sobre o crescimento de *Bacillus* spp. foram determinados conforme Migliore et al. (2013), adaptado para microplacas. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação estéreis onde 200 μL de meio líquido MMCC contendo as diferentes combinações de cobre e bactéria foram adicionados em cada poço. Para tal, um volume de 50 μL de solução estoque de cobre, foi adicionado em cada poço visando atingir as concentrações previamente determinadas de 800; 400; 200; 150; 112,5; 84,4; 63,3; 47,5; 35,6; 26,7; 20,0; 15,0; 11,3; 8,4; 6,3; 3,6; 4,8; 2,7; 2,0; 1,5; 1,1 e 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HC e 300; 150; 75; 37,50; 18,7; 9,3; 4,6; 2,3; 1,15; 0,575 e 0,287 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para SC. Uma alíquota de 50 μL de suspensão bacteriana (4×10^4 UFC mL^{-1}) de cada isolado foi adicionada no poço visando a concentração final de $\sim 10^4$ UFC mL^{-1} previamente determinada por turbidez. Como controle positivo foram utilizados poços contendo meio de cultura sem ingrediente ativo (i.a.) e a suspensão bacteriana. Poços contendo apenas meio de cultura ou meio + cobre foram utilizados como controles negativos. A placa foi mantida em incubadora a 28°C por 24h sob rotação contínua (282 rpm) em leitora de microplacas por espectrofotometria - Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.). O crescimento bacteriano foi estimado de modo indireto por meio da

leitura da absorbância (600 nm) a cada hora e o intervalo hormético foi constituído daquelas doses horméticas (DHs) que conduziram a AACCs (áreas abaixo das curvas de crescimento) significativamente maiores que o controle. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições para cada combinação concentração de Cu + isolado. Todos os experimentos mencionados foram repetidos pelo menos duas vezes de modo independente. Os dados obtidos foram compilados, montadas as curvas de crescimento de cada tratamento e calculada a área abaixo da curva de crescimento no Microsoft Excel 2023[®]. No RStudio (RStudio 2020) os dados foram submetidos a ANOVA de uma via e aplicado o teste de Dunnet a 95% de confiabilidade para avaliar as diferenças no crescimento bacteriano.

Comparação da eficiência do controle biológico (CB) da mancha bacteriana (Mab) por *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* isoladamente e em combinação com cobre

O experimento foi realizado em casa de vegetação contando com sistema de ventilação/resfriamento e umidificação automático (10 mm/10 segundos/h). Plantas de tomateiro do Grupo Santa Cruz (Santa Cruz Kada Gigante), variedade industrial, com

quatro folhas formadas (seis semanas de idade), foram cultivadas em vasos plásticos (2,5 L) contendo argila, areia, palha de arroz e substrato comercial nas proporções de 3:1:1:1 e adubação mineral conforme recomendações para cultura. Dois isolados comerciais (*B. subtilis* linhagem QST 713 (BS) - Serenade®, e *B. amyloliquefaciens* MBI600 (BA) - Duravel®), foram avaliados quanto a sua eficiência no controle da Mab, bem como sua resposta e compatibilidade com o hidróxido de cobre HC, (Supera®), associado ao espalhante adesivo – EAS, (Silwet 77-Ag®). O delineamento em blocos ao acaso (DBC) contou com doze tratamentos, correspondendo, respectivamente a: Serenade; Serenade + EAS; Serenade + Supera; Serenade + Supera + EAS; Duravel; Duravel + EAS; Duravel + Supera; Duravel + Supera + EAS; Supera; Supera + EAS; EAS e Água (controle). Cada tratamento contou com 16 plantas distribuídas em quatro blocos. As plantas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento, a suspensão de cada produto comercial seguiu conforme recomendações do fabricante (Supera® e Serenade®: 4mL L⁻¹; Duravel®: 2,5g L⁻¹ e Silwet 77-Ag®, dose: 0,75 mL L⁻¹) e adaptado para 500 L/ha. Todos os tratamentos foram aplicados duas vezes com intervalos de sete dias entre si. Uma suspensão bacteriana do isolado EH 2020-12 (*Xep copA*-, sensível ao cobre) na concentração de ~10⁸ UFC mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,3) foi preparada em ADE a partir de colônias puras crescidas em meio 523 por 2 dias a 28°C (Jones et al., 2000). Plantas foram pulverizadas na parte adaxial das folhas 24h após a segunda aplicação dos tratamentos e mantidas em casa de vegetação com rega diária. A avaliação da severidade da doença se deu sete dias após a inoculação atribuindo-se notas variando de 1-10 de acordo com a área do tecido foliar afetado por meio de escala diagramática da Embrapa Hortaliças desenvolvida por Quezado-Duval (**Figura suplementar 1**) e calculado o índice de severidade da doença (ISEV) de acordo com McKinney (1923):

$$ISEV(0/0) = \frac{\sum(NP_x N) \times 100}{T \times N_{max}}$$

Onde, NP = número de plantas

N = Nota

T = Total de plantas

N_{max} = Nota máxima

Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e Scott-Knott a 95% de confiabilidade no AgroEstat® 1.1.0.712 2014 (Barbosa e Maldonado Junior 2015).

Otimização do controle biológico da Mab pelo uso da subdose estimulatória de cobre à *Bacillus subtilis* e eficiência da aplicação via “soil drench”

Visando uma otimização do controle biológico exercido por *B. subtilis* linhagem QST 713 - Serenade®, um tratamento incluindo cobre na dose hormética (DH) de 20 µg mL⁻¹ de previamente determinada, foi incluído. Todos tratamentos foram aplicados via foliar e “drench”. A aplicação foliar seguiu conforme descrito no anterior. Para a aplicação via “soil drench”, cada tratamento foi aplicado diretamente sobre o solo dos vasos das plantas após diluição em água no volume de 25 mL/planta, sozinho ou em combinação com o produto cúprico (HC) e avaliada sua capacidade de reduzir a severidade da doença. Seis tratamentos foram elaborados para cada metodologia: Serenade, Serenade + DH, Serenade + cobre comercial, água, cobre comercial, e DH. Cada tratamento contou com 16 plantas distribuídas em quatro blocos. As aplicações, local de realização, condições e delineamento experimental, método de inoculação e avaliação da severidade da doença, seguiram conforme descrito anteriormente. Dados foram submetidos a ANOVA e Scott-

Knott a 95% de confiabilidade no AgroEstat® 1.1.0.712 2014 (Barbosa e Maldonado Junior 2015).

Resultados

Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do cobre sobre *Bacillus* spp.

As CMIs de cobre sobre *Bacillus* spp. podem ser observadas na Tabela 1. Tanto para *BS* quanto para *BA* a CMI de cobre foi 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando aplicado na formulação de sulfato de cobre sobre o meio. Entretanto, para HC a CMI variou entre isolados com halos inibitórios para o cobre aplicado à 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *BS* e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *BA*.

Tabela 1 Inibição do crescimento bacteriano (cm) de *Bacillus subtilis* QST 713 - *BS* (Serenade®) e *B. amyloliquefaciens* MBI600 - *BA* (Duravel®), expostos a diferentes concentrações de sulfato (SC) ou hidróxido (HC) de cobre (em $\mu\text{g/mL}$) aplicado em gota diretamente sobre meio MMCC.

SC*	Halo inibitório (cm)**		HC*	Halo inibitório (cm)	
	<i>BS</i>	<i>BA</i>		<i>BS</i>	<i>BA</i>
3000	1,4	1,4	2000	1,1	0,8
1500	1,1	1,2	1000	0,7	0,8
600	1,0	0,9	800	0,5	0,0
300	0,7	0,6	600	0,0	0,0
150	0,0	0,0	400	0,0	0,0

* Cobre em $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Valores correspondem às médias de dois experimentos independentes e três placas compunham uma única média em cada experimento.

Efeitos de doses subinibitórias no crescimento de *Bacillus* spp. em meio MMCC

líquido

Para *BS* tanto o HC quanto SC como fontes de cobre induziram efeito estimulatório estatisticamente diferentes de seus controles quando aplicadas em doses subinibitórias, enquanto a concentração mais elevada induziu inibição do crescimento. Os valores de OD₆₀₀ superiores aqueles observados na testemunha geraram curvas de crescimento que ilustram um estímulo de até 95% (AACC = 1,305) acima do controle (AACC = 0,669) quando aplicado cobre (HC) à 20 µg mL⁻¹ (**Figura 1A**). O SC fornecendo cobre a 2,3 µg mL⁻¹ estimulou o crescimento bacteriano em até 26% em relação ao controle (**Figura 1B**), respectivamente com AACCs de 7,001 e 5,549.

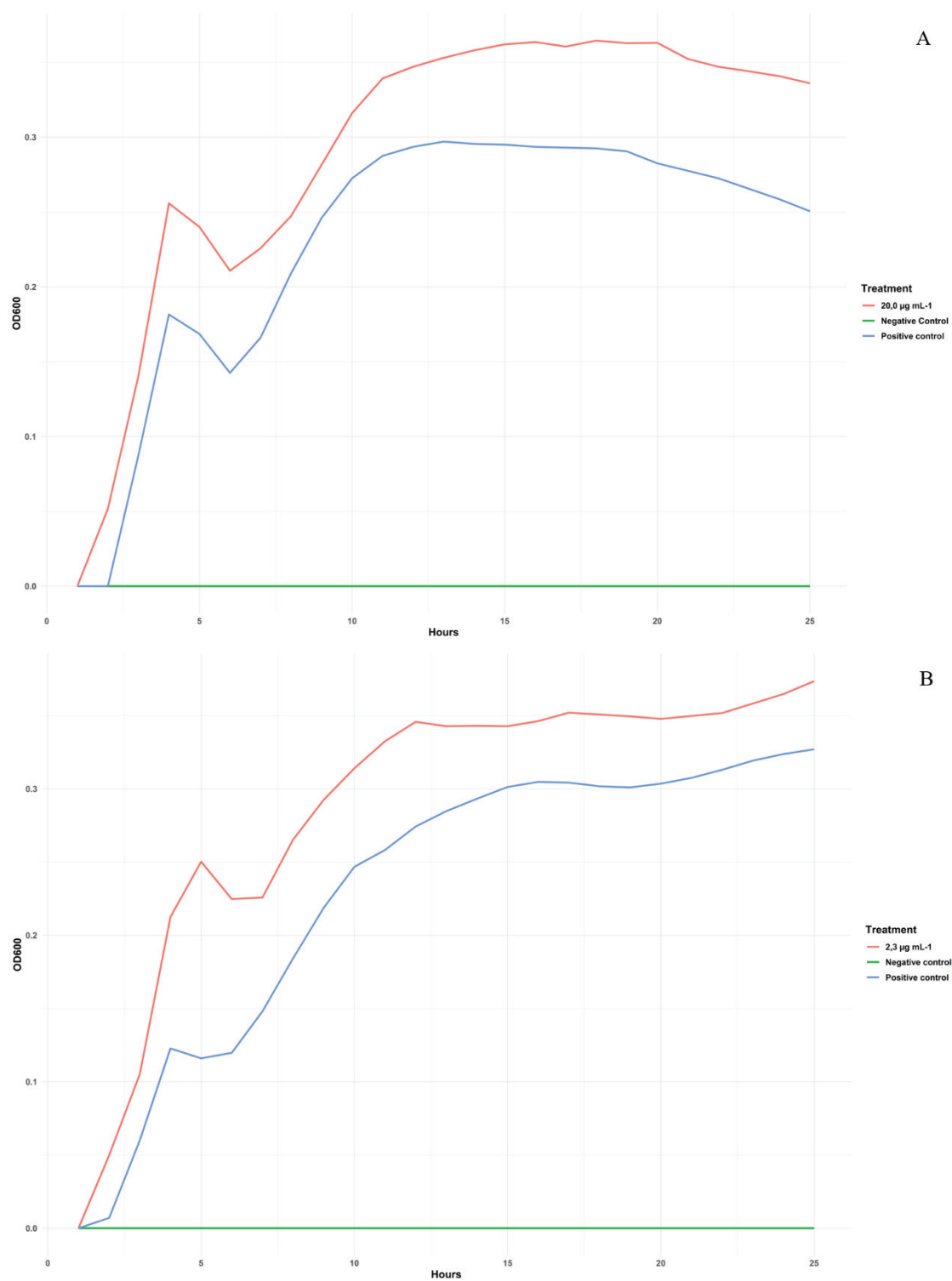


Figura 1 Curvas de crescimento de *Bacillus subtilis* (expresso em OD₆₀₀/h) após 24 horas de exposição ao hidróxido - HC (A) à 20,0 µg mL⁻¹ e sulfato de cobre – SC (B) à 2,3 µg mL⁻¹ difusos em meio MMCC líquido.

HC à $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ induziu uma curva de crescimento com uma AACC = 4,140, enquanto o controle apresentou AACC = 2,830 o que corresponde a um estímulo de até 46% (**Figura 2 A**). Para SC, estímulos significativos e reproduzíveis entre os experimentos foram encontrados para o cobre aplicado à 9,3 e $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$, induzindo estímulos no crescimento de até 40% (AACC = 7,786) e 29% (AACC = 7,202), respectivamente. A bactéria em meio livre de cobre apresentou uma AACC de 5,564 e as curvas de crescimento geradas se distinguiram dos tratamentos apresentando valores de OD₆₀₀ inferiores (**Figura 2 B**).

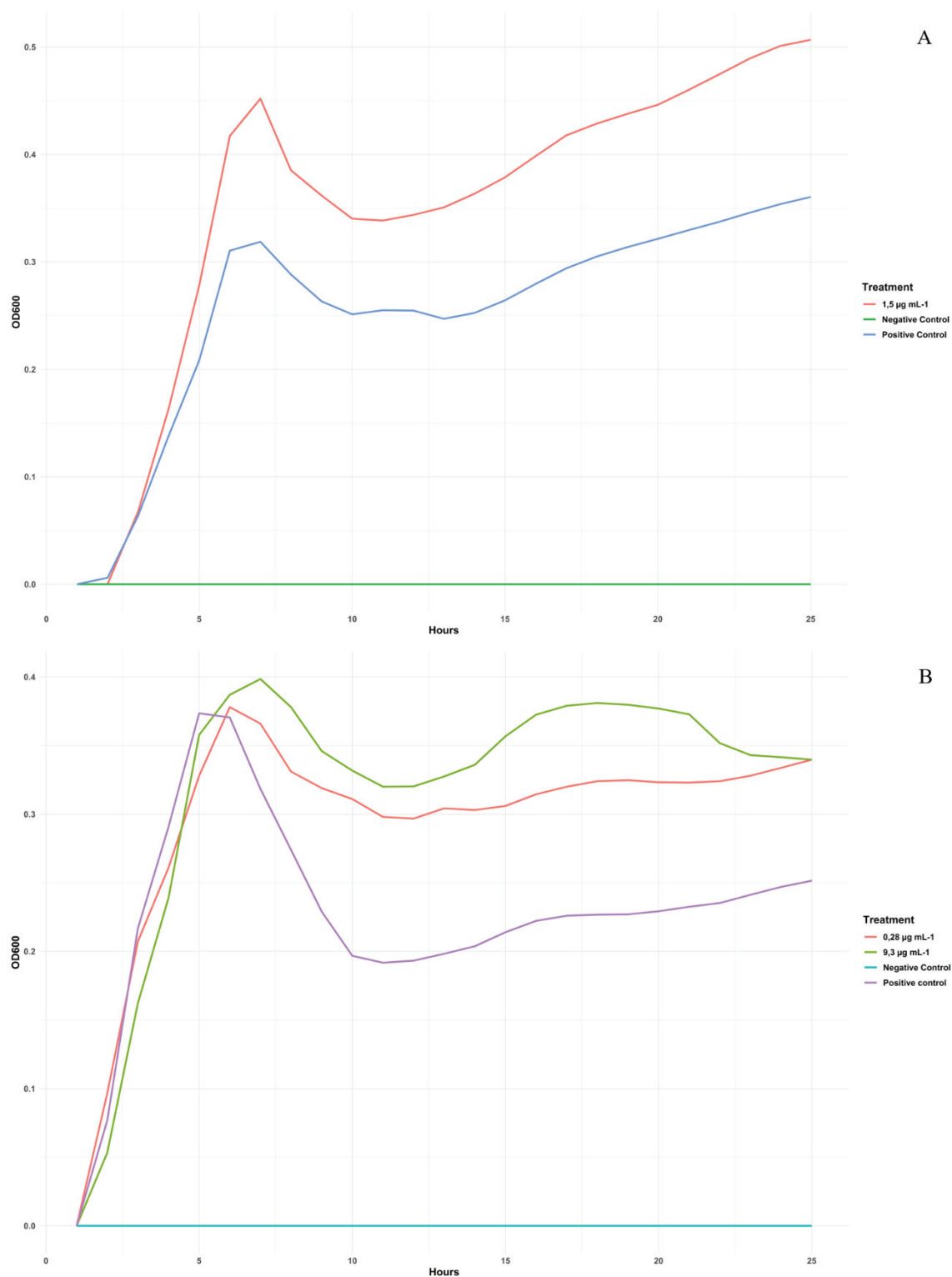


Figura 2 Curvas de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* (expresso em OD₆₀₀/h) após 24 horas de exposição ao hidróxido - HC (A) à 1,5 µg mL⁻¹ e sulfato de cobre – SC (B) à 0,28 e 9,3 µg mL⁻¹ difusos em meio MMCC líquido.

Comparação da eficiência do controle biológico (CB) por *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sobre a mancha bacteriana (Mab)

Aplicações de Duravel ou Serenade sozinhos não reduziram a nível de significância os índices de severidade da Mab e não diferiram da testemunha em ambos os experimentos 1 e 2 (**Tabela 2**). Apenas Duravel + EAS apresentou uma redução na doença com ISEVs menores ($p < 0,05$) que a testemunha nos experimentos, porém, com um desvio padrão elevado. O EAS sozinho não manteve resultados reproduzíveis entre os experimentos, reduzindo ISEV significativamente em relação à testemunha no primeiro experimento e não diferindo no segundo. Com exceção de Duravel + Supera + EAS no 1º. experimento, os tratamentos envolvendo o cobre sozinho ou em combinações com os biocontroladores e/ou EAS, apresentaram índices da doença significativamente menores que testemunhas com resultados consistentes entre experimentos.

Tabela 2 Índice de severidade da mancha bacteriana do tomateiro em resposta ao controle biológico por *Bacillus* spp. combinados ou não ao controle químico ou espalhante adesivo (EAS).

Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
	ISEV (%)	DP	ISEV (%)	DP
Serenade	23 ^a	4,48	21 ^a	1,01
Serenade + EAS	20 ^b	0,83	20 ^a	3,39
Serenade + Supera	17 ^b	1,46	17 ^b	3,44
Serenade + Supera + EAS	21 ^b	2,14	17 ^b	2,34
Duravel	24 ^a	2,08	19 ^a	3,26
Duravel + EAS	20 ^b	3,85	18 ^b	4,06
Duravel + Supera	16 ^b	1,57	17 ^b	1,92
Duravel + Supera + EAS	22 ^a	1,89	16 ^b	0,53
Supera	17 ^b	2,53	16 ^b	1,64
Supera + EAS	19 ^b	1,85	16 ^b	1,85
EAS	19 ^b	1,31	21 ^a	1,98
Água	26 ^a	3,73	21 ^a	1,19

^{a,b} Médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna não diferem entre si pelo método Scott-Knott a 95% de confiabilidade. ISEV: índice de severidade da doença em %, DP: desvio padrão. Doses utilizadas: Supera® e Serenade®: 4mL L⁻¹; Duravel®: 2,5g L⁻¹ e Silwet 77-Ag®, dose: 0,75 mL L⁻¹.

Otimização do controle biológico da mancha bacteriana do tomateiro pelo uso de subdoses estimulatórias de cobre à *Bacillus subtilis* e eficiência da aplicação via “soil drench”

A aplicação da dose hormética (DH) em combinação com *B. subtilis* (Serenade) pela via foliar não aumentou a eficiência do controle biológico (Tabela 3). No primeiro experimento, apenas dois tratamentos (Serenade e DH) diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$), entretanto, apresentando maior severidade da doença e não exercendo controle. No segundo experimento, a combinação do cobre comercial (Supera) e o biocontrolador resultaram em redução não significativa do ISEV, enquanto os demais tratamentos não foram capazes de reduzir a doença.

Tabela 3 Índice de severidade (ISEV) da mancha bacteriana do tomateiro (Mab) em função de diferentes agentes de controle e influência da dose hormética (DH) no controle exercido por *Bacillus subtilis* aplicados via foliar em dois experimentos.

Tratamento	Experimento1		Experimento2	
	ISEV (%)	DP	ISEV (%)	DP
Serenade	46 ^b	2,3	19 ^a	0,6
Serenade + Supera Comercial	32 ^a	2,1	10 ^a	0,7
Supera	30 ^a	1,6	15 ^a	0,7
Serenade + DH*	32 ^a	1,7	16 ^a	0,7
DH	43 ^b	1,8	21 ^a	0,8
Água	34 ^a	1,6	18 ^a	0,8

*Cobre à 20,0 µg mL⁻¹

^{a,b} Médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna não diferem entre si pelo método Scott-Knott a 95% de confiabilidade. ISEV: índice de severidade da doença em %; DP: desvio padrão.

A aplicação via “drench” também não exerceu efeito estimulatório sobre o biocontrolador. No experimento 1, nenhum tratamento diferiu entre si (**Tabela 4**) e no experimento 2 os tratamentos com Serenade, Supera e Serenade + DH apresentaram maiores índices de severidade da doença comparados ao controle.

Tabela 4 Índice de severidade (ISEV) da mancha bacteriana do tomateiro em função de diferentes agentes de controle e influência da dose hormética (DH) no controle biológico exercido por *Bacillus subtilis* aplicados via Drench em dois experimentos.

Tratamento	Experimento1		Experimento2	
	ISEV (%)	DP	ISEV (%)	DP
Serenade	21 ^a	1,8	46 ^b	0,8
Serenade + Supera Comercial	22 ^a	1,6	42 ^a	0,8
Supera	18 ^a	1,7	53 ^b	0,7
Serenade + DH [*]	15 ^a	1,7	43 ^b	0,8
DH	22 ^a	1,8	34 ^a	0,9
Água	21 ^a	1,8	37 ^a	0,8

^{*}Cobre à 20,0 µg mL⁻¹.

^{a,b} Médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna não diferem entre si pelo método Scott-Knott a 95% de confiabilidade. ISEV: índice de severidade da doença em %; DP: desvio padrão.

Discussão

A mancha bacteriana é uma importante doença na cultura do tomateiro e determinar a viabilidade do emprego simultâneo do controle químico e biológico é de vital importância para o manejo integrado da doença (Osdagui et al. 2021). O cobre pode afetar *Bacillus* de diferentes formas e em diferentes níveis, uma vez que este tem efeito inibitório sobre a bactéria (Chillappagari et al. 2010). A variação entre as CMI's observadas para diferentes fontes de cobre e espécies de *Bacillus* é conhecida na literatura (Prabu et al. 2018, Danial e Dardir 2023). É sabido que o sulfato de cobre possui maior solubilidade, disponibilizando mais íons de cobre no meio (Lamichhane et al. 2018), enquanto cobres fixos, como o hidróxido de cobre, possuem menor capacidade de solubilização e liberação lenta do íon cobre (Menkissoglu e Lindow 1991). Deste modo, embora as concentrações dos produtos tenham sido estimadas para fornecer os mesmos equivalentes do íon Cu^{+2} , a solubilidade de cada um pode explicar a diferenças nas CMI's observadas *in vitro*. Adicionalmente, esses resultados sugerem que a compatibilidade dos produtos biológicos avaliados e o cobre pode ser possível quando de baixas doses (Valarmathi et al. 2013).

Os estímulos no crescimento dos isolados pela exposição às concentrações subinibitórias de cobre, associados à inibição em doses elevadas estão dentro dos padrões esperados que poderia ser caracterizado como efeito hormese (Calabrese e Baldwin 2002). Embora esse efeito em função de subdoses de um agente químico de ação antibiótica seja conhecido para outras bactérias (Linares et al. 2006, Migliore et al. 2013, Ishizuka et al. 2018, Iavicoli et al. 2021, Mo et al. 2023), ainda não havia sido relatado para o cobre e em uma bactéria de importância agrônômica. *Bacillus* pode metabolizar o cobre em processos de biorremediação de ambientes contaminados pelo metal pesado

(Wróbel et al. 2023), utilizando-os como fonte de energia e levando a um aumento da população. Assim, pela natureza complexa da relação do cobre com a célula bacteriana (Grass et al. 2011), é provável que o estímulo do crescimento observado em subdoses não esteja relacionado a um único fator, não sendo possível determinar neste estudo uma causa primária ou única do estímulo. Considerando o pouco conhecimento sobre como o fenômeno da hormese interfere em bactérias fitopatogênicas, contando com apenas um relato na área (Peng et al. 2021) ou sobre bactérias de importância no controle biológico, que é o caso de *Bacillus*, é esperado que uma atenção adicional venha a ser dada à hormese e este estudo possa contribuir para a elucidação futura de sua importância.

Neste estudo, dois agentes de controle biológico da Mab registrados no Brasil não se mostraram eficientes em reduzir significativamente a severidade da doença. Embora a literatura demonstre resultados similares quanto ao controle exercido envolvendo as espécies aplicadas neste estudo (Briceno-Montero e Miller 2005), diferentes estudos podem contrastar quanto à eficiência do controle biológico exercido por *Bacillus* em função da formulação ou da combinação de produtos (Abbasi e Weselowski 2015). A redução significativa da severidade da doença em função do uso de Duravel + EAS sugere efeito aditivo na eficácia do produto biológico, e poderia ser explicado pelo seu espalhamento sobre a superfície foliar (Silwet™), porém, quando aplicado sozinho o EAS não apresentou reprodutibilidade entre os experimentos. A ineficiência dos controladores biológicos observadas neste estudo pode ser devida aos efeitos negativos da radiação sobre o agente biocontrolador. Em experimentos em casa de vegetação, ocorreu a exposição do agente biológico à radiação UV, que poderia levar à produção de espécies reativas de oxigênio e culminar em mutagênese e danos ao material genético (Idris et al. 2024). Adicionalmente, dois lotes diferentes foram utilizados para cada produto (um lote

para cada repetição do experimento). Deste modo, embora os produtos comerciais tenham sido utilizados para obter isolados e realizar os testes *in vitro*, as concentrações expressas nos rótulos podem não corresponder à realidade e, se menores, terem resultado na ineficiência do controle biológico. Testes de viabilidade dos produtos não foram realizados antes dos experimentos e poderiam responder a essas questões.

A redução da severidade da doença mais expressiva só foi alcançada quando do controle químico aplicado, sozinho ou em diferentes combinações. Diversos autores combinando aplicações do cobre com o controlador biológico ou outras substâncias químicas também verificaram maior eficácia do controle da Mab (Briceno-Montero e Miller 2005, Roberts et al. 2008, Itako et al. 2014, Abbasi e Weselowski 2015, Soto-Caro et al. 2023). Porém, nesses estudos, a ineficiência dos controladores biológicos quando aplicados sozinhos, somado ao fato de que o cobre quando aplicado sozinho reduz a severidade da doença, parece sugerir que a redução observada na severidade quando da aplicação conjunta é decorrente apenas do cobre. Isso pode ser reforçado pela incompatibilidade dos biocontroladores com o cobre *in vitro* observada neste estudo. Esta incompatibilidade entre cobre e o biocontrolador é reforçada quando mesmo previamente sendo aplicadas as concentrações dentro do intervalo hormético em plantas, não houve ganhos significativos em nenhum tratamento comparado ao controle, independente da aplicação em drench ou foliar. Neste estudo, apenas concentrações horméticas determinadas *in vitro* foram usadas. Um ponto importante a ser levantado sobre a viabilidade do uso de doses subinibitórias de cobre no controle da Mab, é a compatibilidade entre subdoses, que devem ser inibitórias ao patógeno e estimulatórias ao biocontrolador. Cobre em meio MMCC na concentração de $2,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (fonte: hidróxido) foi estimulatório para *B. subtilis*, porém, essa concentração está dentro do

intervalo de doses estimulatórias para *Xep*, cujo intervalo hormético variou de 0.2 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (dados do Capítulo II).

Aqui verificou-se que há uma resposta estimulatória de *Bacillus* spp. a doses subinibitórias de cobre (HC e SC). O controle biológico da Mab por aplicações de Serenade ou Duravel não se mostrou eficiente via foliar ou em “drench” nas condições experimentais testadas. Apenas pulverizações foliares de hidróxido de cobre reduziram a severidade da Mab. Doses subinibitórias de cobre, embora estimulatórias do crescimento bacteriano *in vitro* não exerceram efeito aditivo na capacidade de *B. subtilis* em reduzir severidade da Mab.

Referências

- Abbasi PA, Weselowski B (2015) Efficacy of *Bacillus subtilis* QST 713 formulations, copper hydroxide, and their tank mixes on bacterial spot of tomato. Crop Protection 74: 70–76
- Agrofit – Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em 2024
- Akila AH, Ali MAS, Khairy AM, Elnahal ASM, Alfassam HE, Rudayni HA, Jaber FA, Tohamy MRA (2024) Biological Control of Tomato Bacterial Leaf Spots and Its Impact on Some Antioxidant Enzymes, Phenolic Compounds, and Pigment Content. Biology 13:369

- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2017) Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathology* 66:159-168
- Araújo ER, Pereira RC, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM, Café-Filho AC (2012) sensitivity of xanthomonads causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and in vivo infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Journal of Plant Pathology* 94: 79-87
- Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal FCAV/UNESP p.396
- Briceno-Montero G, Miller SA (2005) Evaluation of biological control options for bacterial spot management during tomato transplant production. *Acta Horticulturae* 695:357–365
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2002) Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology* 21: 91–97
- CEASA-DF (2023) Guia 2023 de frutas e hortaliças comercializadas no DF. Ceasa-DF. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ceasa.df.gov.br/wp-content/uploads/2022/03/Guia-de-frutas-e-hortalicas-tomate-revisado-ascom.pdf](https://www.ceasa.df.gov.br/wp-content/uploads/2022/03/Guia-de-frutas-e-hortalicas-tomate-revisado-ascom.pdf) acesso em janeiro de 2024.
- Chandrasekaran M, Chun SC (2016) Induction of defence-related enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants treated with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biocontrol Science and Technology* 26:1366–1378

- Chillappagari S, Seubert A, Trip H, Kuipers OP, Marahiel MA, Miethke M (2010) Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192:2512–24
- Choi HK, Song GC, Yi HS, Ryu CM (2014) Field evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper. *Journal of Chemical Ecology* 40:882–892
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Batata, cebola e tomate: caracterização da produção e da comercialização na Região Integrada de Desenvolvimento Econômico do Distrito Federal e Entorno – Ride-DF. Brasília, DF: Conab, 2021 p 29
- Danial AW, Dardir FM (2023) Copper biosorption by *Bacillus pumilus* OQ931870 and *Bacillus subtilis* OQ931871 isolated from Wadi Nakheil, Red Sea, Egypt. *Microbial Cell Factories* 22:152
- EPPO (2023) PM 7/110 (2) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. EPPO Bulletin. 53: 558–579. Available in <https://doi.org/10.1111/epp.12960>
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>, acesso em junho de 2024
- Garzón CD, Flores FJ (2013) Hormesis: Biphasic dose-reponse to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. In: Nita M (ed.) Fungicides - showcases of integrated plant disease management from around the world. Rijeka: InTech pp. 311-328

- Grass G, Rensing C, Solioz M (2011) Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5):1541-7
- Iavicoli I, Fontana L, Agathokleous E, Santocono C, Russo F, Vetrani I, Fedele M, Calabrese EJ (2021) Hormetic dose responses induced by antibiotics in bacteria: A phantom menace to be thoroughly evaluated to address the environmental risk and tackle the antibiotic resistance phenomenon. *Science of The Total Environment* 798:149255
- Ibrahim YE, Saleh AA, El Komy MH, Al-Saleh MA (2016) *Bacillus subtilis* QST 713, copper hydroxide, and their tank mixes for control of bacterial citrus canker in Saudi Arabia. *The Journal of Pathology iocv_journalcitruspathology_30994*
- Idris AL, Li W, Huang F, Lin F, Guan X, Huang T (2024) Impacts of UV radiation on *Bacillus* biocontrol agents and their resistance mechanisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40:58
- Idris AL, Li W, Huang F, Lin F, Guan X, Huang T (2024) Impacts of UV radiation on *Bacillus* biocontrol agents and their resistance mechanisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40:58
- Ishizuka M, Imai Y, Mukai K, Shimono K, Hamazu R, Ochi K, Hosaka T (2018) A possible mechanism for lincomycin induction of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek* 111:705-716
- Itako AT, Tolentino-junior JB, Demant LAR, Maringoni AC (2014) Control of bacterial spot of tomato and activation of enzymes related to resistance by chemicals under field conditions. *Journal of Agricultural Science* 6:100-109
- Lamichhane JR, Osdaghi E, Behlau F, Köhl J, Jones JB, Aubertot J-N (2018) Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 38:28

- Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:19484-9
- Liu Y, Kyle S, Straight PD (2018) Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. *mSphere* 3:e00586-17
- Mariano RLR, Souza EB (2016) Manual de práticas em fitobacteriologia. 3th Ed. UFRPE, Recife p. 234
- Mates ADPK, Pontes NC, Halfeld-Vieira BA (2019) *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. *Biological Control* 137:104013
- McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26 (5):195-218
- Melo IS (1998), Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo IS and Azevedo JL (Eds.). *Controle Biológico*. Embrapa, Jaguariúna 1:17-30
- Menkissoglu O, Lindow SE (1991) Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cuprichydroxide deposits on plants. *Phytopathology* 81:1263–1270
- Migliore L, Rotini A, Thaller MC (2013) Low doses of tetracycline trigger the *E. coli* growth: a case of hormetic response. *Dose Response* 11:550-7
- Miljaković D, Marinković J, Balešević-Tubić S (2020) The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms* 8:1037

- Mo LY, Wang J, Qin LT, Yang YL, Liang N (2023) Mechanism of time-dependent toxicity of quinolone antibiotics on luminescent bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 255:114784
- Monteiro L, Mariano RLR, Souto-Maior AM (2005) Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian archives of biology and biotechnology* 48: 23-29
- Olishevskaya S, Nickzad A, Restieri C, Dagher F, Luo Y, Zheng J, Déziel E (2023) *Bacillus velezensis* and *Paenibacillus peoriae* Strains Effective as Biocontrol Agents against *Xanthomonas* Bacterial Spot. *Applied Microbiology* 3: 1101-1119
- Osdaghi E, Jones JB, Sharma A, Goss EM, Abrahamian P, Newberry EA, Potnis N, Carvalho R, Choudhary M, Paret ML, Timilsina S, Vallad GE (2021) A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. *Molecular Plant Pathology* 00:1–20
- Pajčin I, Vlajkov V, Frohme M, Grebinyk S, Grahovac M, Mojićević M, Grahovac J (2020) Pepper Bacterial Spot Control by *Bacillus velezensis*: Bioprocess Solution. *Microorganisms* 8: 1463
- Prabu P, Umamaheswari R, Rao MS (2018) In-vitro compatibility of *Bacillus amyloliquefaciens* IHR BA2 with commercial biocontrol agents and agrochemicals. *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 24: 143-149
- Quezado-Duval AM, Lopes CA (2010) Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. *Embrapa hortaliças* ISSN 1415-3033
- Rabbee MF, Baek K-H (2023) Detection of Antagonistic Compounds Synthesized by *Bacillus velezensis* against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by Metabolome and RNA Sequencing. *Microorganisms* 11:1523

- Ritchie DF (2000) Bacterial spot of pepper and tomato. The Plant Health Instructor. Disponível em [https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/Bacterials pot.aspx](https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/Bacterials%20pot.aspx) acesso em janeiro de 2024
- Roberts PD, Momol MT, Ritchie L, Olson SM, Jones JB, Balogh B (2008) Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar-S-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato Crop Protection 27:1519–1526
- RStudio T (2020) RStudio: Integrated development for R. RStudio, PBC, Boston. MA Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em fevereiro de 2024
- Schulz H (1888) Ueber Hefegifte. Pflügers Arch. European Journal of Physiology 42:517–541
- Silva EL, Freitas-Lopes RL, Lopes UP (2018) Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi and oomycetes: current status and research perspectives. Revisão anual de patologia de plantas 26: 69-80
- Soto-Caro A, Vallad GE, Xavier KV, Abrahamian P, Wu F, Guan Z (2023) Managing Bacterial Spot of Tomato: Do Chemical Controls Pay Off? Agronomy 13(4):972
- Valarmathi P, Pareek SK, Priya V, Ramalingam R, Chandrasekar G (2013) Compatibility of copper hydroxide (Kocide 3000) with biocontrol agents. Journal of Agriculture and Veterinary Science 3:2319-2372
- Wróbel M, Śliwakowski W, Kowalczyk P, Kramkowski K, Dobrzyński J (2023) Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*. International Journal of Environmental Research and Public Health 20:4964

- Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X (2015) Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. Scientific Reports 5: 12975
- Xie S, Zang H, Wu H, Rajer FU, Gao X (2018) Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Molecular Plant Pathology 19: 49–58

CONCLUSÕES GERAIS

1. O gene *copA* foi detectado por PCR em 28,8 % dos isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) avaliados, e sua expressão pode conduzir à resistência ao cobre *in vitro*.
2. Um efeito estimulatório ou tipo-hormese por doses subinibitórias de cobre foi observado em *Xep*, mas sem especificidade em relação ao isolado, ou relação com a presença do gene *copA*. Este efeito levou a aumentos significativos no crescimento bacteriano e produção de biofilme.
3. Subdoses estimulatórias de cobre ao crescimento bacteriano *in vitro* não tiveram efeito significativo na virulência de *Xep* em tomateiros inoculados em casa de vegetação.
4. *Bacillus subtilis* QST 713 e *B. amyloliquefaciens* MBI600 não foram eficientes no controle da Mab e não apresentaram compatibilidade com o cobre *in vitro* em doses acima da CMI, enquanto doses abaixo da CMI induziram resposta estimulatória ao crescimento de ambos isolados.
5. Aplicações de *Bacillus* spp. no controle biológico da Mab não reduziram a severidade da doença em aplicações via foliar ou via “drench” e o cobre em doses estimulatórias *in*

vitro a *Bacillus subtilis*, não apresentou efeito aditivo no controle da doença, comparado aos controles.

PERSPECTIVAS

- 1- Novos estudos são necessários visando verificar o papel dos demais genes do operon *copLAB* na resistência ao cobre e do *copA* como determinante da resistência em *Xep*, e seu impacto na resistência ao cobre em condições controladas e a campo;
- 2- Devido à importância dos genes *cop*, espera-se novas abordagens visando o sequenciamento dos genes e sua expressão em análises transcriptômicas em função do uso de doses inibitórias e subinibitórias;
- 3- O efeito hormese ou respostas que possam ser classificadas como “tipo-horméticas” em bactérias fitopatogênicas, ainda como um campo amplo de pesquisa inexplorado e uma importante lacuna no conhecimento, podendo constituir um objeto de estudo que facilite o entendimento sobre possíveis impactos na epidemiologia de doenças e evolução da resistência bacteriana;
- 4- Estudos visando uma viabilidade e efetividade do controle biológico da mancha bacteriana do tomateiro por *Bacillus* spp., bem como o seu aprimoramento, com o uso de novas metodologias de aplicação, diferentes concentrações dos produtos biológicos, combinações do ativo biológico e cobre, frequência de aplicação, avaliação da permanência do agente biológico sobre a superfície foliar e atividade, bem como os efeitos do controle biológico em intensidades da doença variáveis buscando uma perspectiva de manejo integrado de doenças.