



UTILIZAÇÃO DE *Bacillus amyloliquefaciens* E METABÓLITO SECUNDÁRIO DE *Xenorhabdus szentirmaii* PARA CONTROLE DE DOENÇAS BACTERIANAS EM TOMATEIRO E FEIJOEIRO

MARIANA FERRACIN DE MACEDO

Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Utilização de *Bacillus amyloliquefaciens* e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* para controle de doenças bacterianas em tomateiro e feijoeiro

Mariana Ferracin de Macedo

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio. Área de concentração:
Segurança Alimentar e Sanidade no
Agroecossistema

Campinas

2024

Mariana Ferracin de Macedo

Utilização de *Bacillus amyloliquefaciens* e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* para controle de doenças bacterianas em tomateiro e feijoeiro

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Co-Orientador: Prof^º. Dr. Luís Garrigós Leite

Campinas

2024

Eu, **Mariana Ferracin de Macedo**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Macedo, Mariana Ferracin de.

Utilização de *Bacillus amyloliquefaciens* e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* para controle de doenças bacterianas em tomateiro e feijoeiro. / Mariana Ferracin de Macedo - São Paulo, 2024.

75 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024T.MM02

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Coorientador: Luís Garrigós Leite

Versão do título para o inglês: Use of *Bacillus amyloliquefaciens* and secondary metabolite of *Xenorhabdus szentirmaii* to control bacterial diseases in tomatoes and beans

1. Controle biológico 2. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* 3. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* Bioinsumos I. Macedo, Mariana Ferracin de II. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/02

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mariana Ferracin de Macedo

Título: Utilização de *Bacillus amyloliquefaciens* e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* para controle de doenças bacterianas em tomateiro e feijoeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 02/07/2024

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Suzete Ap. Lanza Destéfano

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. César Júnior Bueno

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Matheus Ap. Pereira Cipriano

Instituição: Universidade Estadual Paulista

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alisson Fernando Chiorato

Instituição: Instituto Agrônomo de Campinas

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Sandra Cristina Vigo

Instituição: Instituto de Desenvolvimento Rural

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Mariano de Macedo e Regina C. Ferracin de Macedo, que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim para que pudesse chegar até aqui. Sem este apoio, nada disso teria acontecido.

Ao meu irmão Gustavo Ferracin de Macedo e a minha cunhada Rafaela Mendes de Macedo que está com meu sobrinho José Mateus no forninho, por todo carinho, torcida e apoio.

Ao meu noivo Murilo Jorge Gonçalves, por todo incentivo, apoio e parceria durante esta jornada, sempre ao lado nos momentos bons e ruins.

Aos demais familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Aos alunos, pesquisadores e colegas de trabalho que foram ou ainda estão no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (Instituto Biológico): Mariana Tonin, Lucas Vitor, Mariana Appy, que, de alguma forma, colaboraram para que este trabalho acontecesse e, principalmente, pela convivência, amizade, ensinamentos e parceria.

A Professora Dr^a. Suzete Ap. Lanza Destéfano (Instituto Biológico) pela orientação, oportunidade, ensinamentos, paciência, amizade, por acreditar na minha capacidade e por toda ajuda durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Dr. Luís Garrigós Leite (Instituto Biológico), pela co-orientação, apoio e pela colaboração durante o meu doutorado.

À Dr^a. Sandra Cristina Vigo (Instituto de Desenvolvimento Rural – Paraná), por todo apoio, ajuda e paciência ao sanar minhas dúvidas durante o desenvolvimento dos meus experimentos.

Aos membros da Banca de Defesa desta tese de doutorado, por aceitarem participar deste trabalho e por colaborarem.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

MACEDO, Mariana Ferracin de. **Utilização de *Bacillus amyloliquefaciens* e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* para controle de doenças bacterianas em tomateiro e feijoeiro.** 2024. 75 f. Campinas – SP. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

O tomate é uma hortaliça amplamente consumida no país e está sujeita a pragas e doenças que prejudicam a produtividade. A mancha bacteriana do tomateiro, causada pela bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep), ataca as folhas e os frutos, podendo acarretar um impacto na produção e comercialização. O feijão é uma das leguminosas que faz parte da alimentação humana e sofre ataque de doenças no campo e, as perdas na produção podem ser significativas quando há a presença da bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), causando a murcha de *Curtobacterium* que, devido a sua forma de disseminação, seu controle é mais difícil. A utilização da agricultura convencional levou a desequilíbrios ecológicos, resistência de pragas e doenças, além dos impactos ambientais e, novas estratégias de controle estão sendo utilizadas, entre elas, o controle biológico. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 para o controle de Xep IBSBF 2349 e de Cff IBSBF 1290. O isolamento das bactérias simbiotes foi realizado a partir da hemolinfa de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com nematoides *Steirnenema rarum* PAM 25. A atividade antimicrobiana dos metabólitos, cultura líquida ou filtrado, contra as referidas fitobactérias foi avaliada por meio da medição dos halos de inibição de crescimento em testes *in vitro*. Também foi avaliada a capacidade antimicrobiana da linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 em testes *in vitro* e *in vivo* (casa de vegetação). Os resultados em casa de vegetação com plantas de tomate mostraram que o metabólito secundário *X. szentirmaii* PAM 25 proporcionou redução da severidade da doença em aproximadamente 40% enquanto no tratamento com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 a redução foi de aproximadamente 60%. Os tratamentos com os produtos comerciais *B. subtilis* QST 713 e fluazinam mostraram redução de 43% e 89% respectivamente. Nos experimentos com plantas de feijão, a redução dos sintomas da doença foi de aproximadamente 38% no tratamento com metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 e de aproximadamente 30% com a linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, e nos tratamentos com *B. subtilis* QST 713 e fluazinam a redução foi de 27,5% 35% respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: controle biológico; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

ABSTRACT

MACEDO, Mariana Ferracin de. **Use of *Bacillus amyloliquefaciens* and secondary metabolite of *Xenorhabdus szentirmaii* to control bacterial diseases in tomatoes and beans.** 2024. 75 f. Campinas – SP. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

Tomatoes are widely consumed vegetables in Brazil and are subjected to pests and diseases that affect yield. One such disease is bacterial spot, caused by the bacterium *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep), which attacks leaves and fruits and can have an impact on production and commercial value. Beans are legumes that are part of the human diet and are subjected to disease attacks in the field. Production losses can be significant when the bacterium *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) is present, causing Curtobacterium wilt, which is more difficult to control because of its mode of dissemination. Conventional agriculture has led to ecological imbalances, pest and disease resistance to control measures, and environmental impacts. New control strategies include being used, including biological control. This study aimed to evaluate the potential of *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 and secondary metabolite from *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 for the control of Xep IBSBF 2349 and Cff IBSBF 1290. Symbiotic bacteria were isolated from the hemolymph of *Galleria mellonella* caterpillars infected with the nematode *Steirnenema rarum* PAM 25. The antimicrobial activity of the metabolites, liquid culture or filtrate, against the mentioned phytopathogens was evaluated by measuring the growth inhibition halos *in vitro*. *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 strain was also evaluated for antimicrobial capacity *in vitro* and *in vivo* (greenhouse). The results of the greenhouse assay with tomato plants showed that the secondary metabolite from *X. szentirmaii* PAM 25 reduced disease severity in approximately 40%, whereas in the treatment with *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, the reduction was around 60%. The treatments with the commercial products *B. subtilis* QST 713 and fluazinam resulted in reductions of 43% and 89%, respectively. In the experiments with bean plants, disease symptoms were reduced around 38% using the secondary metabolite of *X. szentirmaii* PAM 25 and approximately 30% with *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321. As for *B. subtilis* QST 713 and fluazinam the reduction attained was 27.5% and 35%, respectively.

KEYWORDS: biological control; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folha e fruto da planta de tomate com sintomas da mancha bacteriana causada pela <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349	22
Figura 2 - Folha e fruto da planta de tomate com sintomas da mancha bacteriana causada pela <i>X. perforans</i> IBSBF 2349	22
Figura 3 – Esquema da metodologia do isolamento da bactéria entomopatogênica <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25.....	30
Figura 4 – Esquema da metodologia do crescimento bacteriano e obtenção do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25	31
Figura 5 – Esquema da metodologia da avaliação da atividade antimicrobiana do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25	33
Figura 6 - Esquema da metodologia da avaliação do efeito antagonista da linhagem de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 sobre o crescimento de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349 e <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290....	34
Figura 7 - Esquema da metodologia de avaliação em casa de vegetação da ação inibitória do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e do isolado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 no patossistema tomateiro x <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349: (A) fermento e (B) aspersão.	36
Figura 8 - Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade da doença causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> em folhas de tomateiro. Os valores representam a área foliar doente em porcentagem.....	37
Figura 9 - Esquema da metodologia de avaliação em casa de vegetação da ação inibitória do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e do isolado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 no patossistema feijoeiro x <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290	39
Figura 10 - Halos de inibição de crescimento das fitobactérias formados pela adição do filtrado do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 após seis dias de crescimento, frente às linhagens de (A) <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290 e (B) <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349.....	41
Figura 11 - Halos de inibição de crescimento das fitobactérias formados pela adição da cultura líquida do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 após seis dias de crescimento, frente às linhagens de (A) <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290 e (B) <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349.....	41

- Figura 12 - Halos de inibição de crescimento das fitobactérias formados pela adição da cultura líquida do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 após nove dias de crescimento, frente às linhagens de (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e (B) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349.....42
- Figura 13 - Halos de inibição formados pelo *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, sobre as linhagens de (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e (B) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349.....44
- Figura 14 - Experimento com a cultivar de tomate Colt com inoculação pelo método de abrasão com os diferentes tratamentos sendo que todas as plantas foram previamente inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, (E) *Bacillus subtilis* QST713; segunda inoculação 7 D.A.I com (F) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (G) PAM 25, (H) *Bacillus subtilis* QST713, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).45
- Figura 15 - Experimento com a variedade de tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2 pelo método de abrasão com os diferentes tratamentos aplicados preventivamente e posteriormente inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349. (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, (E) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 filtrado, (F) *Bacillus subtilis* QST713, (G) Fluzinam, (H) Oxicloreto de cobre, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).47
- Figura 16 - Experimento com a variedade de tomate Ravena com inoculação pelo método de aspersão com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, sendo que todas as plantas foram previamente inoculadas com (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 PAM 25, (F) Fluzinam, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).49
- Figura 17 - Experimento com a variedade de tomate Santa Clara com inoculação pelo método de aspersão com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, sendo que todas as plantas foram previamente inoculadas com (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D)

Bacillus subtilis QST713, (E) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, (F) Fluazinam, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015)..... 51

Figura 18 - Experimento em feijoeiro com inoculação nas raízes com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no mês de março. (A) Testemunha, (B) Controle positivo *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito PAM 25, (F) Fluazinam. 56

Figura 19 - Experimento em feijoeiro com inoculação nas raízes com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no mês de junho. (A) Testemunha, (B) Controle positivo *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito PAM 25, (F) Fluazinam. 59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Evolução dos sintomas causados por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290, realizado no Experimento 1 com leituras aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria nos tratamentos com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, <i>Bacillus subtilis</i> QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam, utilizando a escala diagramática de acordo com Maringoni (2002).....	55
Gráfico 2 - Evolução dos sintomas causados por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290, realizado no Experimento 2 com leituras aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria nos tratamentos com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, <i>Bacillus subtilis</i> QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam, utilizando a escala diagramática de acordo com Maringoni (2002).....	57
Gráfico 3 – Evolução dos sintomas causados por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290, realizado no Experimento 3 com leituras aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria nos tratamentos com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, <i>Bacillus subtilis</i> QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam, utilizando a escala diagramática de acordo com Maringoni (2002).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação do tamanho do halo de inibição de crescimento (centímetros) das fitobactérias produzido pela cultura líquida (não filtrado) e filtrado do metabólito <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 após crescimento do mesmo em seis dias e nove dias....	40
Tabela 2 - Avaliação dos halos de inibição de crescimento, em centímetros, de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290 e para <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349, utilizando-se diferentes concentrações do extrato filtrados de PAM 25.	43
Tabela 3 - Avaliação do tamanho do halo de inibição de crescimento (em centímetros) produzido pela linhagem de <i>B. amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 frente à <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (Cff) IBSBF 1290 e <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> (Xep) IBSBF 2349.	43
Tabela 4 – Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar Colt pelo método de abrasão em casa de vegetação com os tratamentos <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, metabólito secundário <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, <i>Bacillus subtilis</i> QST713; segunda inoculação 7 D.A.I com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, PAM 25, <i>Bacillus subtilis</i> QST713.....	45
Tabela 5 - Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2 pelo método de abrasão em casa de vegetação com os tratamentos <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, filtrado do metabólito secundário <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, <i>Bacillus subtilis</i> QST713, Fluazinam e Oxícloreto de Cobre.....	46
Tabela 6 - Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar tomate Ravena pelo método de aspersão em casa de vegetação nos meses de março, junho e novembro com os seguintes tratamentos: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, <i>Bacillus subtilis</i> QST713 e Fluazinam.....	48
Tabela 7 - Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar tomate Santa Clara pelo método de aspersão em casa de vegetação nos meses de março, junho e novembro de 2023 com os seguintes tratamentos: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, <i>Bacillus subtilis</i> QST713 e Fluazinam.....	50
Tabela 8 - Avaliações da redução da severidade da mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349 obtidas nos diferentes tratamentos e	

métodos de inoculação utilizados nas variedades de tomate Colt, rasteiro Petomech VF 1 & 2, Ravena e Santa Clara.....	53
Tabela 9 – Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) dos três experimentos realizados para o controle de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290 no feijoeiro IAC 1850 em casa de vegetação nos meses de março, maio e junho de 2024 com os seguintes tratamentos: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, <i>Bacillus subtilis</i> QST713 e Fluazinam.	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	A cultura do tomateiro	20
2.1.1	Etiologia de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	20
2.1.2	Sintomatologia da mancha bacteriana do tomateiro	21
2.2	Cultura do feijoeiro	23
2.2.1	Etiologia de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	24
2.2.2	Sintomatologia da murcha de <i>curtobacterium</i> no feijoeiro.....	25
2.3	Controle Biológico	26
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Linhagens bacterianas e condições de cultivo	29
4.2	Isolamento de bactéria entomopatogênica <i>Xenorhabdus szentirmaii</i>.....	30
4.3	Crescimento bacteriano e obtenção do metabólito secundário de <i>X. szentirmaii</i> PAM 25.....	31
4.4	Avaliação da atividade antimicrobiana do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25.....	32
4.5	Avaliação do efeito antagonista da linhagem de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 sobre o crescimento de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349 e <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> IBSBF 1290.....	33
4.6	Avaliação em casa de vegetação da ação inibitória do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e do isolado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 no patossistema tomateiro x <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> IBSBF 2349	34
4.7	Avaliação em casa de vegetação da ação inibitória do metabólito secundário de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e do isolado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 no patossistema feijoeiro x <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>.....	37
4.8	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS	40
5.1	Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25.....	40

5.2	Avaliação da ação inibitória <i>in vitro</i> da linhagem de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 sobre o crescimento de fitobactérias	43
5.3	Avaliação da ação inibitória dos metabólitos secundários de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e da linhagem de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 no patossistema tomateiro x <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	44
5.4	Avaliação em casa de vegetação (<i>in vivo</i>) da ação inibitória do metabólito PAM 25 e da linhagem de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 no patossistema feijoeiro x <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	54
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO.....	64
8	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A agricultura tem como principal função a produção de alimentos e, o Brasil, tem se destacado no setor agrícola, responsável por 24,4% do PIB em 2023, com um aumento de 5,5% de hectares para produção em relação ao ano de 2022, e entre este aumento estão presentes as culturas do feijão e tomate (CEPEA, 2023; IBGE, 2024).

O tomateiro é uma cultura de grande importância econômica cuja produção ocorre durante o ano todo, sendo uma das hortaliças mais consumidas no país, com uma produção de 74.374 kg há⁻¹ (IBGE, 2024). Entretanto, essa cultura pode ser acometida por uma ampla variedade de pragas e doenças que causam queda na produção e para combatê-las são utilizados grandes volumes de defensivos agrícolas (CONAB, 2019).

Uma das doenças de grande impacto na produção de tomate é a mancha bacteriana do tomateiro que pode ser causada por quatro diferentes espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* e *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. (Constantin et al., 2016; Jones et al., 2004; Morinière et al., 2020) Dentre estas espécies, destaca-se *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep), patógeno de maior ocorrência no Brasil. A contaminação por este microrganismo é de difícil controle devido à falta de cultivares resistentes e, ainda, da ausência de produtos químicos ou biológicos eficazes (Araújo et al., 2017; Inoue-Nagata et al., 2016; Quezado-Duval; Lopes, 2010).

O feijoeiro é outra cultura importante para a economia do país, fazendo com que o Brasil seja um dos maiores produtores do grão segundo a FAOSTAT (2023). Essa leguminosa, possui muitas propriedades nutricionais, sendo tradicionalmente utilizada na cozinha brasileira em todas as regiões do país (Silva e Wander, 2013). Entretanto, quando o feijoeiro é plantado principalmente após a colheita da soja, e com a presença do patógeno *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) nos restos culturais, pode ocorrer grandes prejuízos na produção.

A murcha de *Curtobacterium* é considerada uma das doenças de maior importância do feijoeiro, ocasionando a morte prematura das plantas quando o ataque ocorre no início do desenvolvimento devido a obstrução dos vasos do xilema. Este fitopatógeno consegue sobreviver nos restos culturais, nas sementes e na presença de hospedeiros alternativos, sendo, as sementes, as principais fontes de inóculo (Soares, 2017; Theodoro; Maringoni, 2018).

Diante da importância do cultivo do tomateiro e do feijoeiro, o ataque de patógenos pode levar à impactos econômicos resultantes da queda da produção e várias estratégias de

manejo têm sido empregadas para o controle das doenças causadas por esses fitopatógenos como rotação de culturas, uso de cultivares resistentes e sementes saudáveis e, cobre como produto químico para controlar esses fitopatógenos. O uso de agrotóxicos no Brasil aumentou significativamente a partir dos anos 2000, coincidindo com a expansão do agronegócio no país. Essa alta demanda por agrotóxicos também reflete a internacionalização da agricultura brasileira (Silva; Santos, 2023). O uso excessivo leva ao desequilíbrio ecológico, extinguindo os organismos que estão presentes no ambiente, além de levar à resistência de insetos pragas, doenças, plantas daninhas, causando impactos ao meio ambiente e ao homem (Bettiol; Morandi, 2009).

Com o objetivo de se obter uma produção mais sustentável, foram desenvolvidas estratégias de controle de doenças com o emprego de macro e microrganismos que originaram o conceito de controle biológico (Bettiol; Morandi, 2009). Segundo Parra *et al.* (2002), o controle biológico caracteriza-se pelo uso de inimigos naturais que atuam em diversos estágios de desenvolvimento de patógenos (tais como vírus, fungos, bactérias, nematoides, entre outros) responsáveis por doenças em plantas e animais. Ainda, pode ser aliado aos tratamentos culturais para o aumento da população de antagonistas no ambiente (Bettiol *et al.*, 2008).

Atualmente para o controle de fitopatógenos existem produtos formulados com fungos como *Trichoderma*, *Beauveria* e *Metarhizium*; bactérias endofíticas e antagonistas, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*, e, ainda, há que se citar bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos (NEP), pertencentes aos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que são produtoras de antibióticos, antimicóticos, antifúngicos e outros compostos que possuem potencial para uso na agricultura (Filho *et al.*, 2010; Gualtieri *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 no controle da mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 e da murcha de curtobacterium do feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é originário das regiões do norte do Equador e Sul do Chile se estendendo até a América Central, uma vez que é uma planta que consegue se adaptar em vários microclimas e solos (Bauchet; Causse, 2012; Liang et al., 2017). É uma das principais hortaliças cultivadas mundialmente, fazendo parte da alimentação de diversas maneiras, seja *in natura* ou de forma industrializada, como molhos e extratos (CONAB, 2019).

Segundo a FAOSTAT (2023), o Brasil está entre os dez maiores países produtores de tomate, com uma produção acima de 3 milhões de toneladas, sendo que a China lidera a produção com 66 milhões de toneladas, seguido da Índia e Turquia. No Brasil, a estimativa da safra de 2024 é de 4,2 milhões de toneladas, um aumento de 6,3% em relação ao ano de 2023, e este aumento se deu em relação ao maior rendimento, com o estado de Goiás como maior produtor, sendo a maioria destinada para indústria. Os estados de São Paulo, predominando o tomate tipo salada, e Minas Gerais aparecem como grandes produtores logo em seguida (CONAB, 2019; IBGE, 2024). Grande parte da produção mundial do fruto é destinada para a indústria, pois há uma demanda por parte da população por alimentos que sejam práticos para preparar e armazenar, como em caixas do tipo longa vida, além dos crescentes mercados de *fast food* que utilizam produtos como o *catchup* (Melo; Vilela, 2004; Pedroso, 2020).

2.1.1 Etiologia de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

No ano de 1914, na África do Sul, Ethel Doidge observou uma doença no tomateiro, a qual denominou como cancro no tomate e seu agente causal como *Bacterium vesicatorium*. No mesmo ano, nos Estados Unidos, os pesquisadores Gardner e Kendrick identificaram uma doença semelhante que causava mancha e classificou o agente como *B. exitiosum* (Doidge, 1921; Jones et al., 1998; Jones et al., 2004). No entanto, em 1923, Gardner e Kendrick fizeram comparações entre as bactérias e verificaram que não havia diferenças entre elas, concluindo que se tratava da mesma espécie, classificada então como *B. vesicatorium* Doidge (Quezado-Duval, 2003; Jones et al., 2004). Segundo Jones (1998), o agente causal da mancha bacteriana (“bacterial spot”) passou a ser denominado *Pseudomonas vesicatoria* e no ano de 1930, como *Phytomonas vesicatoria*. Depois da proposição do gênero *Xanthomonas* onde foram alocadas 19 espécies através de análises bioquímicas, *Phytomonas vesicatoria* foi reclassificada como

Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson. Em 1978, este fitopatógeno foi novamente reclassificado como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Quezado-Duval; Lopes, 2010; Young et al., 1978).

A mancha bacteriana era considerada como sendo causada por um só grupo do gênero *Xanthomonas*, até que Stall *et al.* (1994) reconheceram que, na verdade, a doença era causada por espécies distintas dividindo-as em dois grupos. No ano seguinte, Vauterin *et al.* (1995) efetuaram um estudo, baseado em hibridização DNA-DNA, onde as espécies de *Xanthomonas* foram novamente reclassificadas e, dessa forma, *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi reclassificada como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* grupo A e *X. vesicatoria* como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* grupo B. Devido a variabilidade de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, e levantamentos de isolados de vários países, foi realizada uma nova reclassificação dentro desse grupo onde *X. axonopodis vesicatoria* grupo A passou a ser denominada *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e o grupo B ficou classificado como *X. vesicatoria*. Ainda, foram descritas duas novas espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro, Xep representando o grupo C e *X. hortorum* pv. *gardneri*, grupo D (Jones et al., 2004; Utami; Meale; Young, 2022).

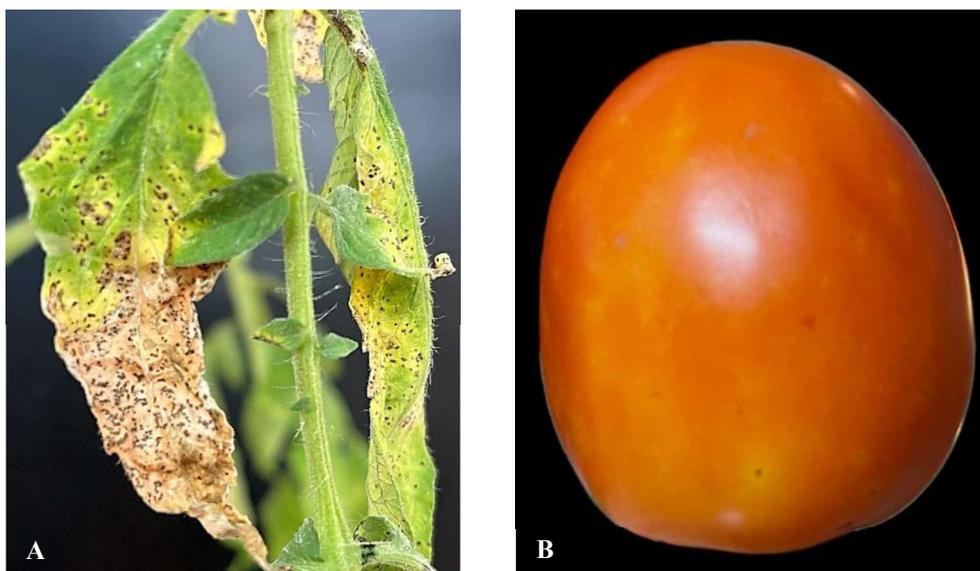
Atualmente, todas as espécies causadoras da mancha bacteriana estão presentes no Brasil, sendo Xep e *X. hortorum* pv. *gardneri* os patógenos de maior ocorrência (Araújo et al., 2017). Isso pode estar relacionado ao fato de que *X. hortorum* pv. *gardneri* se adapta melhor em locais com maiores altitudes e *X. perforans* é a mais difundida por ter mais adaptação a altas temperaturas, maior competitividade e adaptabilidade (Araújo et al., 2011; Araújo et al., 2017; Hert et al., 2005). As espécies *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* e *X. vesicatoria* possuem baixa diversidade e estão mais ligadas às sementes de tomates híbridos importados (Quezado-Duval et al., 2005).

2.1.2 Sintomatologia da mancha bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana do tomateiro é vista como uma doença importante por parte dos produtores, devido às perdas nas lavouras, e a infecção ocorre diretamente na parte aérea da planta, como caules, folhas, pedicelos, flores e frutos, aparecendo em qualquer estágio de desenvolvimento, prejudicando, assim, sua comercialização (Quezado-Duval; Lopes, 2010). Nas folhas os sintomas são caracterizados por pequenas áreas encharcadas que possuem formato irregular e bordas definidas, podendo começar pelos bordos das folhas, avançando pelo centro, causando uma necrose e, podendo ou não apresentar um halo amarelado ao redor. Com o avanço da doença, essas lesões coalescem, aparentando uma queima, causando a seca das

folhas e, em seguida a desfolha, com escaldadura dos frutos, comprometendo, assim, a qualidade do fruto e redução da produtividade (Nascimento, 2009; Mates, 2017; Quezad-Duval; Lopes, 2010). (Figura 1).

Figura 1 - Folha e fruto da planta de tomate com sintomas da mancha bacteriana causada pela *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349



Fonte: Macedo, 2023

Inicialmente, nos frutos, são observadas pequenas lesões circulares de coloração escura e, conforme o aumento da lesão, são formadas crostas com halos verde-escuros a amarelados, predispondo ao ataque de fungos oportunistas e assim, inviabilizando o comércio (Abrahamian et al., 2021b; Quezad-Duval; Lopes, 2010). Segundo Potnis *et al.* (2015), *X. euvesicatoria* pv. *perforans* não ataca os frutos na mesma frequência que *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria*. No pecíolo, flores e caule, os sintomas iniciais são pequenos pontos esbranquiçados e, conforme o desenvolvimento da doença, passam a ter características de lesão corticosa com bordas elevadas. Quando ocorre infecção durante a floração, a doença pode ocasionar queda das flores (Nascimento, 2009; Quezad-Duval; Lopes, 2010). As condições climáticas favoráveis para o crescimento da bactéria variam de 25 a 28°C, com umidade relativa entre 95 e 100% (Abrahamian et al., 2021b; Marcuzzo, 2008).

A disseminação da bactéria ocorre através de mudas contaminadas, principalmente quando cultivadas em altas densidades, sendo estas condições favoráveis para a colonização da planta, visto que, os estômatos ou ferimentos são portas de entrada para o microrganismo. Outra forma de disseminação ocorre através da água da chuva em curtas distâncias, irrigação por

aspersão, pelo ar e práticas culturais que podem causar ferimentos na planta (Abrahamian et al., 2021a; Bernal; Berger 1996; McInnes et al., 1988)

Abrahamian *et al.* (2021a) avaliaram a disseminação de Xep através de gotas de água e o efeito da temperatura sobre a população da bactéria. Os autores observaram que temperatura abaixo de 24°C resultam em diminuição do inóculo e conseqüentemente menor disseminação da doença, enquanto que na temperatura de 27°C e alta densidade da bactéria, o patógeno chega a percorrer 1,5 metros, podendo infectar outras plantas.

2.2 Cultura do feijoeiro

Embora as oleaginosas sejam uma das principais commodities no Brasil, o feijão comum também possui grande importância na economia mundial principalmente na alimentação, fazendo parte da culinária de vários países.

Atualmente, a Índia é o maior produtor do grão no mundo com 3.941 milhões de toneladas, seguido do Brasil com uma produção de 3 milhões de toneladas e Myanmar com 2.363 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2023).

No Brasil, o feijão é cultivado em vários estados, e em algumas regiões pode-se encontrar até três safras por ano, com a primeira safra ou safra das “águas” nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e nos estados do norte e nordeste do país, a segunda safra é a das “secas” que é plantada nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e um único período no Norte; a safra de inverno que ocorre no Centro-Sul do país (Silva; Wander, 2013). Segundo o levantamento de dados do IBGE (2024), os estados que mais produzem no Brasil são Paraná, Minas Gerais e Bahia na primeira safra, na segunda safra o estado do Mato Grosso ultrapassou a Bahia e, na terceira safra, a estimativa é que os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo tenham o destaque na produção. Esses dados reforçam a importância da cultura, pois é a quarta maior área colhida quando comparado com outras commodities.

O feijão possui características organolépticas, sendo fonte de proteína, minerais e vitaminas e, geralmente, é consumido junto do arroz, uma combinação presente na maioria das famílias de todas as classes sociais (Moraes; Menelau, 2017).

As áreas destinadas a cultura do feijoeiro também estão menores com o passar dos anos, o que não impactou na produção, pelo contrário, ela tem aumentado devido as tecnologias empregadas, como melhoramento de sementes para obter cultivares mais produtivas e com

resistência a algumas pragas e doenças, além de serem adaptadas as regiões que serão cultivadas (EMBRAPA, 2023; Oliveira, 2022).

Da mesma maneira, as tecnologias para o cultivo do feijão evoluíram para o aumento da produtividade, a mesma pode ser impactada por ataque de doenças e pelo agente causal *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, que é responsável pela murcha de *Curtobacterium*.

2.2.1 Etiologia de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

A principal característica da doença no feijão é a murcha acompanhada de amarelecimento e quando a infecção ocorre no início, podem-se observar sintomas nas folhas de plântulas com presença ou ausência de clorose e, ainda, nanismo e morte das plântulas. Nas lavouras, quando a doença se desenvolve, pode-se observar a formação de reboleiras, apesar de também existirem plantas doentes de maneira isolada (Hedges, 1922; Valentini et al., 2010). Nas plantas adultas quando infectadas, a maioria das folhas ficam murchas, principalmente nas condições ambientais favoráveis, que ocorrem nos períodos de clima quente e seco, se desenvolvendo melhor nas temperaturas de 24 a 27°C, com as máximas de 35 a 37°C e, quando não ocorre nas condições ideais, o desenvolvimento é mais lento até a fase de maturação dos grãos (Harveson et al., 2015; Theodoro; Maringoni, 2010; Valentini et al., 2010).

O patógeno causador da murcha de *curtobacterium* no feijoeiro foi descrito em 1921 por Florence Hedges como *Bacterium flaccumfaciens* e foi constatado que a bactéria causava sintomas nos vasos da planta e às vezes, um escurecimento do anel vascular em plantas de feijão (Hedges, 1922). Ao observar que a bactéria avançava para várias lavouras de feijão em vários estados dos Estados Unidos e em alguns países da Europa, Hedges (1926) pensou em ter confundido os sintomas com a ferrugem comum, mas ao comparar, pôde concluir que se tratava de uma bactéria transmitida por sementes e que sobrevive por até cinco anos. Dowson (1942) alocou as bactérias que possuíam características gram-positivas e corineformes no grupo *Corynebacterium*, passando a ser classificadas como *Corynebacterium flaccumfaciens*. Com o passar dos anos, novas variantes foram descobertas mudando a nomenclatura para *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum* e depois para *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum* (Osdaghi; Young; Harveson, 2020; Schuster et al., 1968). No ano de 1983, Collin e Jones reclassificaram o patógeno como Cff, baseado em suas características bioquímicas e genéticas. A murcha bacteriana foi uma das principais doenças bacterianas na cultura do feijão no início dos anos de 1950, principalmente em áreas irrigadas

(Harveson, et al., 2015). No Brasil, o primeiro relato da doença em lavouras de feijão foi no ano de 1995 no estado de São Paulo e, posteriormente em mais regiões do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, e na safra de 2011/2012, ocorreu o primeiro relato do patógeno na cultura da soja no estado do Paraná (Maringoni; Rosa, 1997; Soares et al., 2013).

2.2.2 Sintomatologia da murcha de *curtobacterium* no feijoeiro

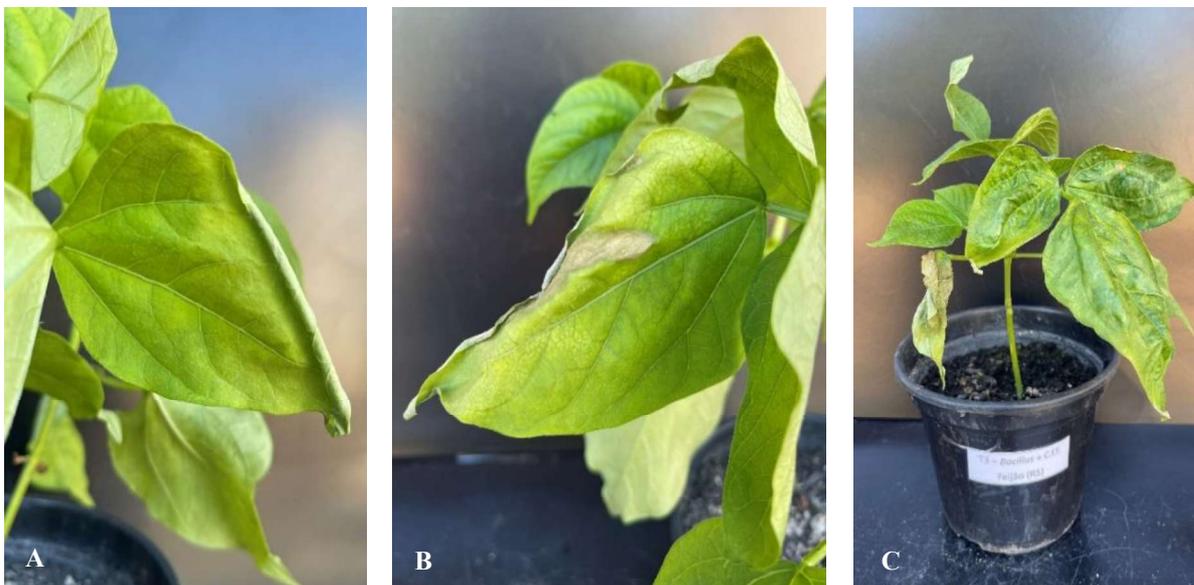
A bactéria coloniza os vasos do xilema, bloqueando a passagem de seiva bruta, causando nas plantas sintomas de flacidez e, no caso de uma infecção conjunta com o fungo causador da murcha-de-fusarium, é comum observar-se o escurecimento do vaso (Theodoro; Maringoni, 2010).

A semente quando está contaminada pode aparentar características enrugadas e ocorre uma coloração do tegumento podendo ser amarela, laranja, rosa ou púrpura, enquanto a vagem permanece sem sintomas. O surgimento de uma coloração amarelada nas sementes pode-se levar a confusão com sintomas de outras doenças como crestamento bacteriano, contudo, nem sempre os sintomas são visíveis (Harveson, 2013; Theodoro; Maringoni, 2000; Valentini et al., 2010).

Quando plântulas são originadas de sementes infectadas, os sintomas da doença podem ser observados no cotilédone e no segundo estágio de trifólios, causando a morte. Porém, sintomas diferentes podem ser observados em espécies distintas de feijão, como no feijão-caupi, onde ocorre a presença de clorose ao redor da necrose (Osdaghi; Young; Harveson, 2020).

Quando ocorre a inoculação das plântulas de maneira artificial em casas de vegetação, os sintomas podem variar dependendo do isolado utilizado e da variedade do feijoeiro e, os primeiros sintomas são o murchamento das folhas cotiledonares e as plantas jovens permanecem atrofiadas, com características de amarelecimento e murcha, não ocorrendo a produção de vagens férteis, enquanto nas folhas, ocorre o amarelecimento, queima e murcha dos bordos foliares (Figura 2 A, B e C) (Osdaghi; Young; Harveson, 2020; Wendland et al., 2016).

Figura 2 - Sintomas da murcha de *Curtobacterium* em feijoeiro. (A) Encarquilhamento do bordo foliar, (B) Queima do bordo foliar e (C) Murcha e flacidez das folhas com clorose



Fonte: Macedo, 2023

2.3 Controle Biológico

As práticas agrícolas utilizadas, tais como o desmatamento, queimadas e excesso de produtos químicos visando o controle de pragas e doenças, levaram a um desequilíbrio ecológico, sendo necessária a utilização de outras técnicas para aumentar a produção de alimentos de uma maneira mais sustentável, como o uso do controle biológico (Gomes, 2019; Lapicciarella et al., 2022).

Controle Biológico pode ser definido como um “fenômeno natural que consiste na regulação de plantas e animais por inimigos naturais e que seriam os agentes de mortalidade biótica” (Parra et al., 2023). Em relação a fitopatologia, são microrganismos antagonistas que controlam outros microrganismos (De Melo; Nascimento; Serra, 2021).

Para poder proteger as plantas do ataque de patógenos, pode-se empregar a utilização de microrganismos antes ou após a ocorrência da doença, e estes organismos de biocontrole possuem diferentes mecanismos de ação, tais como: antagonismo direto, causando o enfraquecimento do patógeno ou até mesmo sua eliminação; ação antibiótica sobre os patógenos; competição por espaço e nutrientes para sobrevivência quando na presença de outro microrganismo; produção de enzimas que rompem as estruturas celulares dos patógenos; e

indução dos mecanismos de defesa da planta (Agrios, 2005; De Melo; Nascimento; Serra, 2021).

Com relação aos microrganismos utilizados no controle de patógenos, os mais conhecidos são as bactérias do gênero *Bacillus*, constituído em 1872 por Ferdinand Chon, no qual o nome serve tanto para referência a um gênero de bactérias bem como para sua forma de bastão. Além disso, muitas espécies do gênero *Bacillus* são isoladas de diferentes ambientes. Por exemplo, a espécie *Bacillus subtilis* é comumente encontrada no solo, enquanto *Bacillus cereus* foi isolada de superfícies de folhas (filoplano), e *Bacillus amyloliquefaciens* detectado em tecidos internos das plantas (Logan; De Vos, 2009).

Uma das principais características desse gênero é a produção de endósporos que são formados intracelularmente e são diferentes das células vegetativas parentais, e possui forma circular, ovalada ou cilíndrica em condições aeróbicas, possui refração a luz e são altamente resistentes a estresses químicos e físicos que são letais para as células vegetativas (De Vos et al., 2009; De Melo; Nascimento; Serra, 2021; Filho et al., 2010; Logan; De Vos, 2009).

O uso de *Bacillus* spp. pode levar as plantas a desenvolverem um mecanismo de defesa contra estresses abióticos e bióticos, promovendo o fortalecimento da planta que podem ser adquiridos ou induzidos indiretamente, além de produzirem metabólitos que fazem parte do grupo das fengicina, iturina e surfactina, produzir esporos resistentes e agir no controle de vários patógenos (Cawoy et al., 2015; Ongena; Jacques, 2008; Lanna Filho et al., 2010; Yruela, 2015). A capacidade de controlar fitopatógenos e produzir esporos ajuda na formulação de produtos comerciais, com bom período de prateleira e com resistência às condições de armazenamento (Cawoy et al., 2015).

As bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* possuem uma relação benéfica com sua planta hospedeira, que fornece às bactérias os nutrientes necessários para seu desenvolvimento e sobrevivência ou vice-versa e, ainda, podem atuar diretamente na planta ao liberar metabólitos específicos (Pei et al., 2021). Devido a estas características, essas bactérias são utilizadas como agentes de biocontrole de doenças de plantas ou como promotoras de crescimento, podendo ser aplicadas de diversas maneiras, seja no solo, no tratamento de sementes, aplicações foliares, entre outros métodos (Hallmann et al., 1997; Musson et al., 1995). Rocha *et al.* (2016) testaram vários isolados do gênero *Bacillus* para o controle de Cff através do tratamento de sementes de feijão, observando uma redução da doença. O uso de *B. amyloliquefaciens* apresentou atividade antagonista no controle de *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* nos testes *in vitro* e em plantas, além de atividade de promoção de crescimento dessas plantas por colonizar a rizosfera (Gautam et al., 2019).

Outros microrganismos que possuem capacidade de controlar doenças são as bactérias simbiotes de nematóides entomopatogênicos (NEPs), dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, que são associadas aos NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steirnenema*, respectivamente. Essas bactérias estão presentes no interior do nematoide que, ao entrar no hospedeiro, liberam as bactérias na hemocele onde se multiplicam, produzindo toxinas e exoenzimas hidrolíticas (Forst; Clarke, 2002). Os metabólitos produzidos pelas bactérias dos NEPs possuem muitos compostos bioativos que podem ser utilizados tanto na medicina quanto na agricultura, como antibióticos, antimicóticos, inseticidas, nematicidas, antivirais, antiulcerosa e antineoplástica (Wang et al., 2011).

As bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* têm capacidade inseticida e produzem antibióticos que podem ser utilizados para inibir crescimento de fungos e bactérias, mostrando uma grande capacidade para uso agrícola (Webster et al., 2002). Os compostos antibióticos do gênero *Xenorhabdus* foram reportados por vários pesquisadores como Xenorhabdins (McInerney et al., 1991a), Xenorcumacinas (McInerney et al., 1991b), Xenorxides (Li et al., 1998), Nematophin (Li; Chen; Webster, 1997), Xenematide (Lang et al., 2008), Szentiamide (Ohlendorf et al., 2011), Xenofuranone A e B (Brachmann et al., 2006), Benzylideneacetona (Ji et al.; 2004), Iodinina (Fodor et al., 2008), entre outros.

As bactérias do gênero *Photorhabdus* também produzem diversos compostos tais como, Antraquinona e Hidroxi-stilbeno (Forst; Neelson, 1996), Estilbeno (fitoalexina) (Hu et al., 1999), Photobactin (Ciche et al., 2003), Carbapenem (Derzelle et al., 2002), Epóxido (Hu et al., 2006) e Indigoidina (Brachmann et al., 2012).

O metabólito Nematophin foi utilizado em testes *in vitro* contra uma série de fungos como por exemplo *Phytophthora infestans*, e em bactérias tais como *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e foi observado que esta substância possui grande atividade antimicótica e antibacterida (Li; Chen; Webster, 1997).

Dreyer *et al.* (2019) identificaram dois compostos, PAX peptídeos e xenocoumacina, provenientes de uma bactéria isolada *Xenorhabdus khoisanae* e observaram que possui alta atividade antimicrobiana ao testar com bactérias *B. subtilis*, *Escherichia coli* e com o fungo *Candida albicans*.

Bactérias isoladas do nematoide *Photorhabdus luminescens* foram testadas para controlar o mofo branco da soja em testes *in vitro* e *in vivo*, e observaram que diminuiu a incidência do fungo em mais de 50% (Shiomi; Ferreira; Melo, 2017).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial de *Bacillus amyloliquefaciens* e metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* para controle de doenças da mancha bacteriana do tomateiro e murcha de *curtobacterium* no feijoeiro

Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 e *C. falccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 frente aos filtrados produzidos pela bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 em diferentes concentrações e períodos de crescimento da bactéria no meio de cultura por meio de testes *in vitro*;
- Avaliar a suscetibilidade de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 e *C. falccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 frente a bactéria *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 por meio de teste *in vitro*;
- Avaliar a ação inibitória de *B. amyloquefaciens* IBSBF 3321 e do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 sobre as bactérias fitopatogênicas *X. euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 e *C. falccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em testes em casa de vegetação (*in vivo*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LBV) e na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico (ULRCB), no Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária (CAPSA) do Instituto Biológico, em Campinas, São Paulo.

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, Xep IBSBF 2349 e Cff IBSBF 1290, cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas,

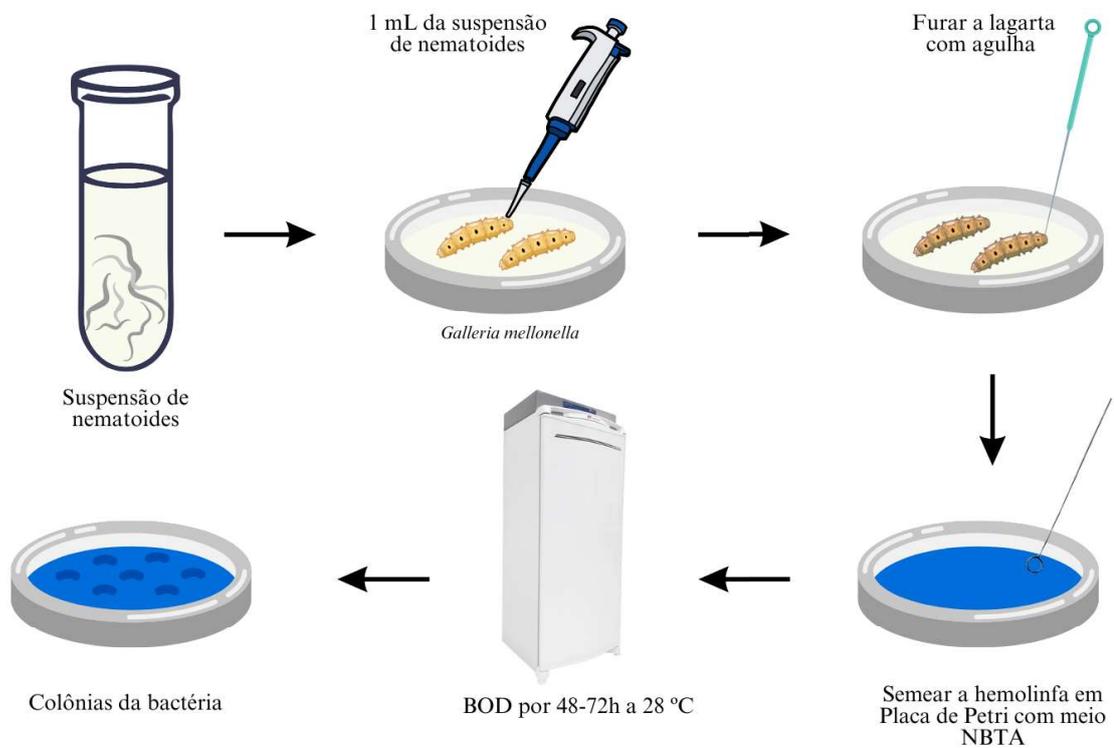
São Paulo, foram cultivadas em meio Ágar Nutriente (NA) (extrato de carne 3 g; peptona 5 g; cloreto de sódio 5 g e ágar 18 g, q.s.p. 1.000 mL) e incubadas a 28°C por 48 horas.

4.2 Isolamento de bactéria entomopatogênica *Xenorhabdus szentirmaii*

O isolamento das bactérias simbiotes foi realizado de acordo com Akhurst (1980), a partir da hemolinfa de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com uma suspensão de 1 mL dos isolados de nematoides *Steirnenema raum* PAM 25. Confirmada a morte das lagartas, elas foram desinfestadas superficialmente com álcool 90% e flambadas.

Posteriormente, foi efetuado um ferimento na parte frontal da lagarta com auxílio de um alfinete entomológico e a hemolinfa foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultivo NBTA (ágar nutriente acrescido de 25 mg de azul de bromotimol; 40 mg de cloreto de trifeniltetrazólio; água destilada q.s.p. 1.000 mL). As placas foram mantidas em câmara de germinação no escuro a 28 °C, por 48 a 72 horas (Figura 3).

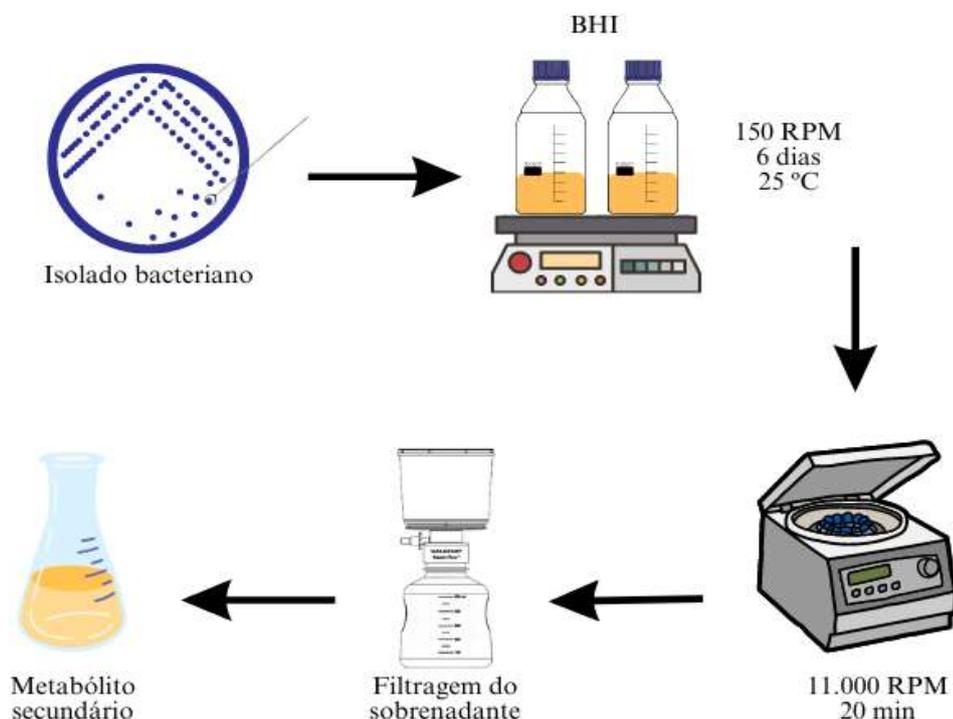
Figura 3 – Esquema da metodologia de isolamento da bactéria entomopatogênica *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25



4.3 Crescimento bacteriano e obtenção do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25

Para obtenção dos metabólitos, seguiu-se a metodologia de Cimen *et al.* (2021). Uma única colônia isolada da bactéria *X. szentirmaii* produtora do metabólito secundário PAM 25, em fase I, foi coletada e adicionada em garrafa tipo Schott de capacidade 1 L contendo 500 mL de meio BHI Merck[®], com incubação a 30°C, por seis e nove dias seguindo a metodologia de Chacón-Orozco *et al.* (2020), sob agitação de 150 rpm. Decorridos esses períodos, o caldo bacteriano foi centrifugado a 4°C por 15 min a 11.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore[®] de 0,22 µm com auxílio de uma bomba à vácuo visando a obtenção dos metabólitos secundários livres de células bacterianas. Os filtrados foram utilizados em seguida para os testes de inibição de crescimento das fitobactérias selecionadas (Figura 4).

Figura 4 – Esquema da metodologia do crescimento bacteriano e obtenção do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25

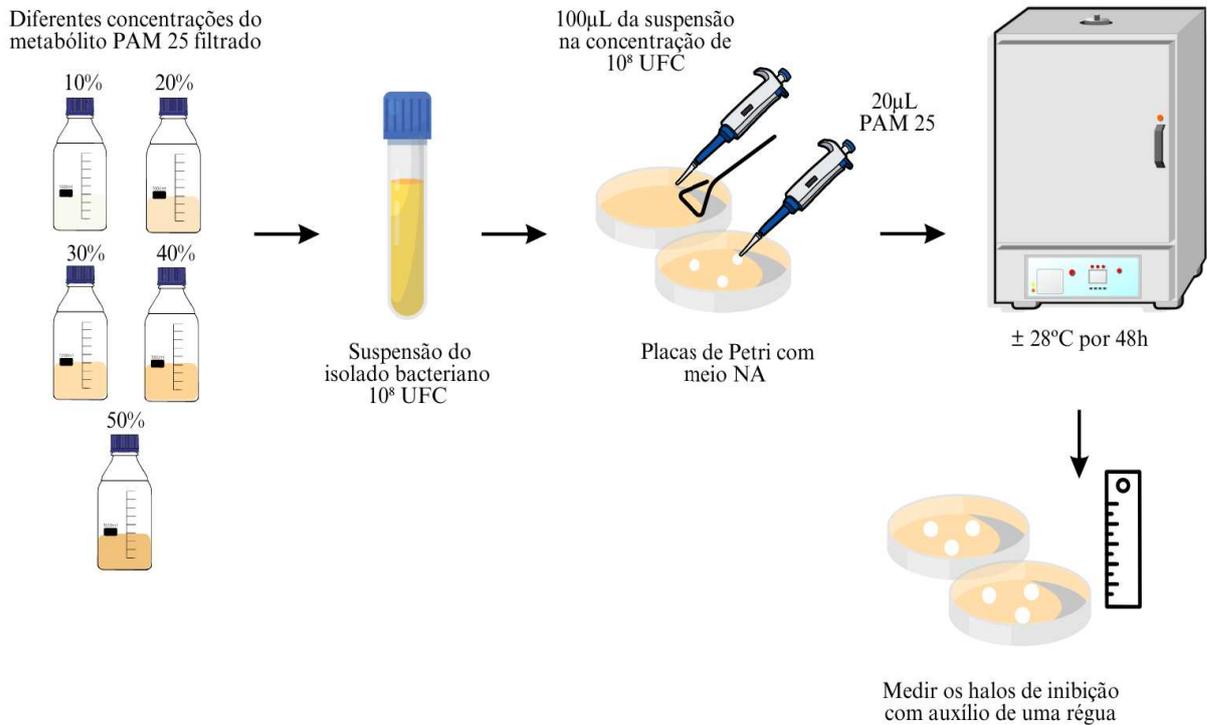


4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25

A atividade antimicrobiana do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 obtidos foi avaliada por meio da medida do halo de inibição de crescimento das diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas de importância agrícola de acordo com Chacón-Orozco *et al.* (2020) com adaptações e Motoyama *et al.* (2003).

As fitobactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo NA e incubadas em estufa a 28 °C por 48 h. Em seguida, foi efetuada uma suspensão bacteriana em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de água destilada autoclavada e agitada em Vortex para dissolução das células. Após a agitação, uma alíquota de 100 µL foi semeada em uma placa de Petri contendo o mesmo meio de cultivo com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após a secagem das suspensões, três discos de antibiograma (Laborclin®) de 0,6 cm de diâmetro foram adicionados em pontos equidistantes e, posteriormente, embebidos com uma alíquota de 20 µL do filtrado da bactéria simbiote isoladas dos NEPs. As placas foram incubadas a 28°C e após 48 h foi realizada a avaliação por meio da medida do halo de inibição de crescimento realizada com o auxílio de uma régua. Esse experimento foi realizado em dois períodos diferentes de crescimento da bactéria simbiote, com seis e nove dias de incubação. A atividade antimicrobiana também foi avaliada em diferentes concentrações dos metabólitos: 10, 20, 30, 40 e 50%, com diluição em água destilada esterilizada (Figura 5).

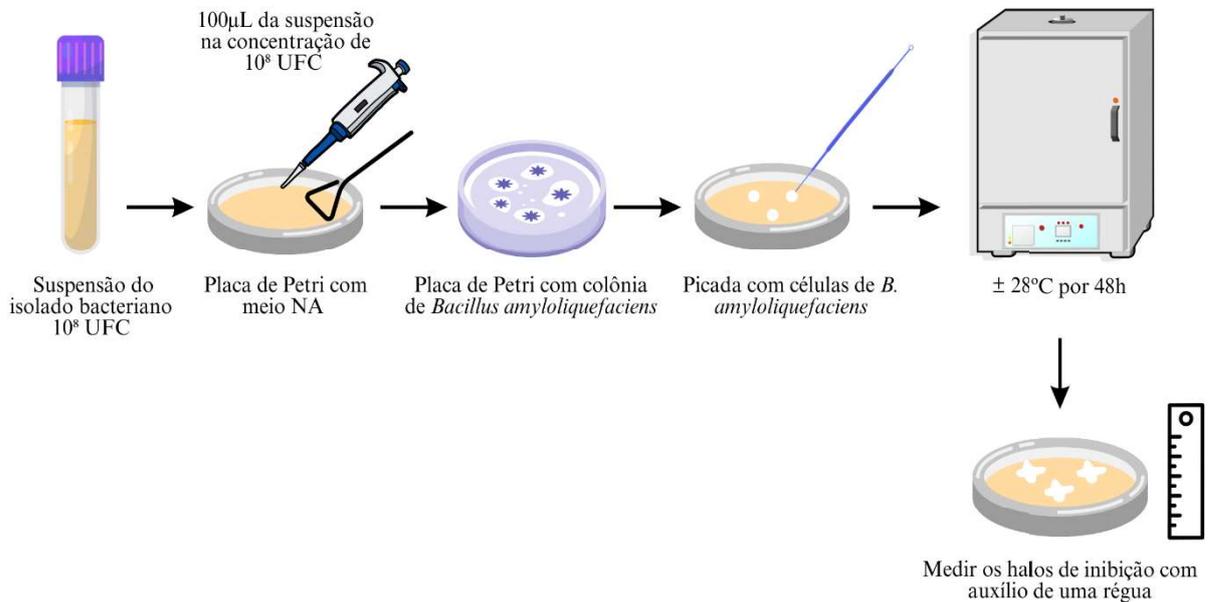
Figura 5 – Esquema da metodologia da avaliação da atividade antimicrobiana do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25



4.5 Avaliação do efeito antagonista da linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 sobre o crescimento de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290

A atividade antibacteriana também foi testada com a linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 de acordo com a metodologia de Gautam *et al.* (2019). O experimento foi realizado de maneira semelhante aos anteriores, mas com algumas modificações: ao invés da utilização de discos de antibiograma, a linhagem de *Bacillus* foi inoculada no meio de cultivo por pontos (3 pontos) com auxílio da ponta reta de uma alça descartável. As placas foram incubadas a 28°C e após 48 horas foi realizada a medição dos halos de inibição de crescimento (Figura 6).

Figura 6 - Esquema da metodologia da avaliação do efeito antagonista da linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 sobre o crescimento de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290



4.6 Avaliação em casa de vegetação da ação inibitória do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e do isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 no patossistema tomateiro x *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349

Foram testadas as variedades Colt®, Santa Clara, Ravena® e tomate rasteiro cultivar Petomech VF 1 & 2, obtidas inicialmente por meio de plantio em sementeira. Quando as mudas atingiram o primeiro par de folhas, elas foram transplantadas em vasos de 2,1 L, contendo somente substrato orgânico Biomix®. A partir do momento em que as plantas apresentaram aproximadamente quatro pares de folhas verdadeiras ou tamanho de 40 a 50 cm de altura, foi realizada uma câmara úmida com a utilização de saco plástico contendo um pouco de água para cobrir a planta e fechado com elástico por 24 h antes da inoculação, visando abertura dos estômatos. Após este período, o plástico foi retirado e 15 mL dos diferentes tratamentos foram aplicados na planta com auxílio de um borrifador como ação preventiva:

- 1) linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹;
- 2) metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 na concentração de 100%;
- 3) produto biológico comercial composto por linhagem *B. subtilis* QST713 na concentração de 2 L.ha⁻¹;
- 4) produto químico com o princípio ativo fluazinam (fungicida) na concentração de 1 L.ha⁻¹ e;

5) fungicida oxiclóreto de cobre na concentração de $3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ($500\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ingrediente ativo).

As concentrações dos três últimos produtos comerciais foram calculadas conforme as recomendações dos fabricantes e foram incluídos no estudo para comparação de performance, uma vez que são amplamente utilizados pelos produtores no campo.

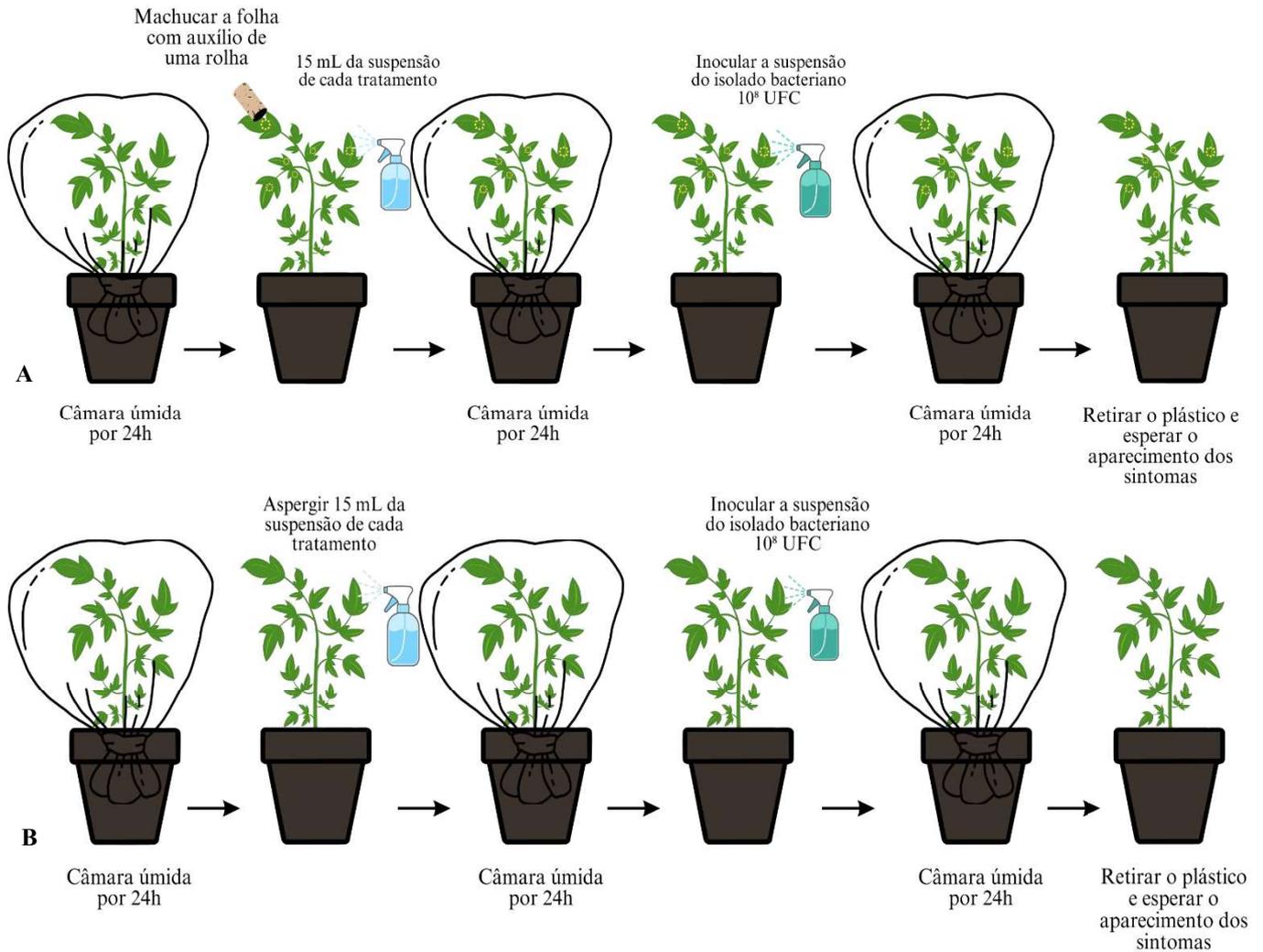
Após a aplicação preventiva, o saco plástico foi recolocado por 24 h e, passado esse período, as plantas foram inoculadas com Xep IBSBF 2349 na concentração de $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, os plásticos foram novamente colocados por mais 24 h.

A inoculação de Xep foi realizada por dois métodos diferentes:

- 1) Ferimento de acordo com Rodrigues *et al.* (2017) com modificações. Nesse caso, as folhas mais jovens foram lesionadas na face abaxial, com o auxílio de uma rolha contendo um pedaço de lixa na ponta (procedimento tipo mata-borrão). Em seguida, 15 mL de cada produto foi aplicado por aspersão com o auxílio de um borrifador até ponto de escorrimento.
- 2) Aspersão de uma suspensão de 15 mL da fitobactéria na concentração de $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, ajustada pela escala de Mc Farland.

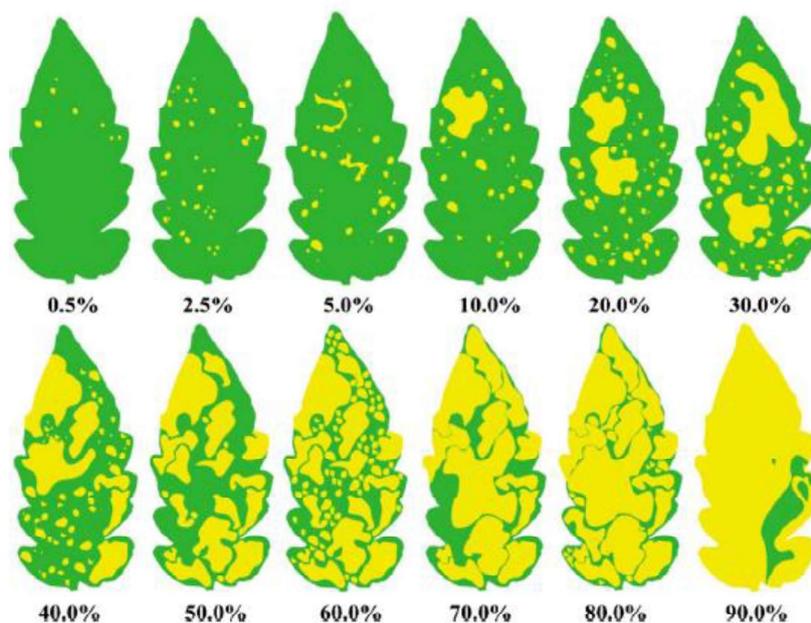
Nos testes iniciais com as cultivares de tomate Colt e tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2 foi utilizada a metodologia de ferimento (Figura 7A), entretanto, nos testes subsequentes optou-se pela metodologia de aspersão sem ferimentos prévios, por ser mais próxima à condição de campo (Figura 7B). No controle negativo foi realizada aspersão com água destilada e no controle positivo, inoculação com a fitobactéria.

Figura 7 - Esquema do teste de patogenicidade em casa de vegetação para avaliação da ação inibitória do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e do isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 no patossistema tomateiro x *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349: (A) método por fermento e (B) método por aspersão.



A avaliação dos sintomas da doença foi efetuada sete dias após a inoculação (D.A.I.) para os ensaios com fermentos e, a partir de dez dias para os testes realizados por aspersão. As avaliações seguiram a escala diagramática elaborada por Duan *et al.* (2015).

Figura 8 - Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade da doença causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* em folhas de tomateiro. Os valores representam a área foliar doente em porcentagem



Fonte: Duan *et al.* (2015)

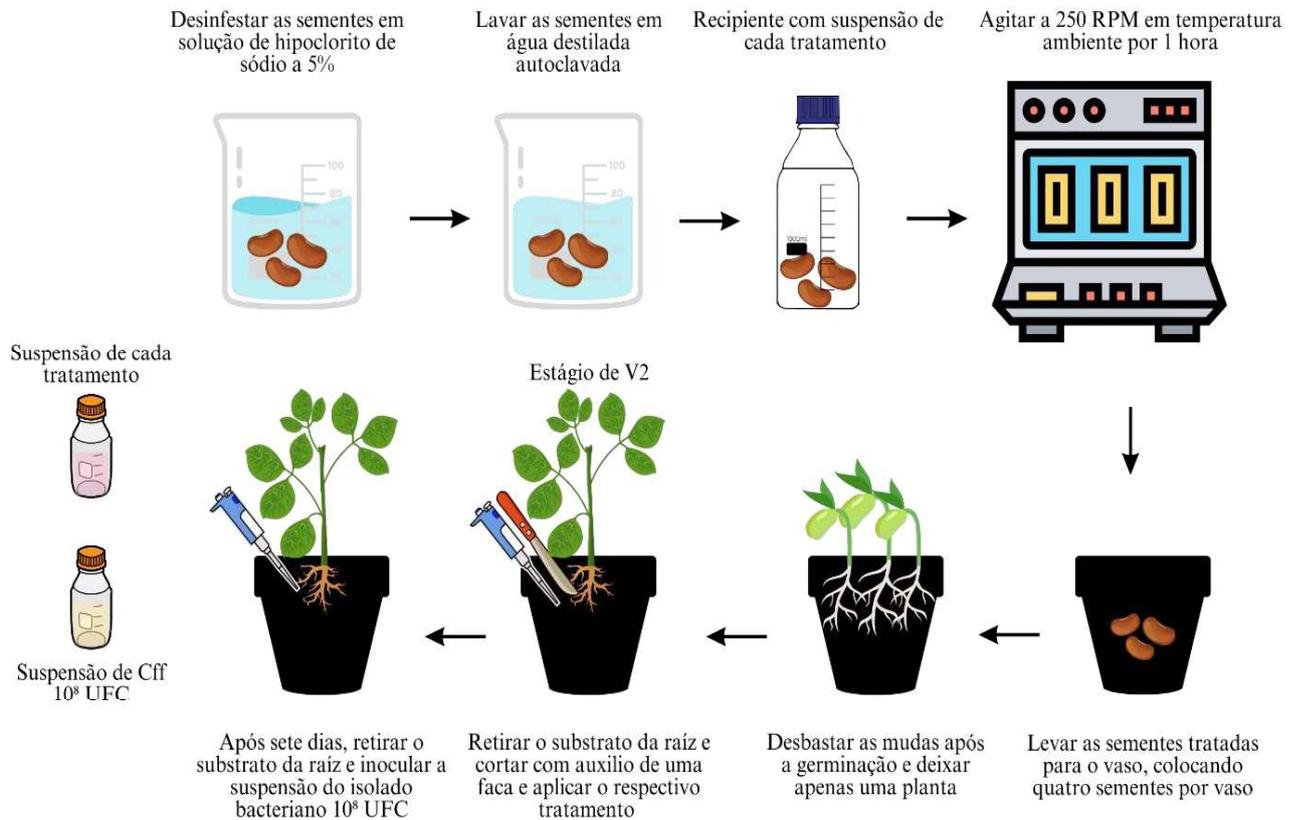
Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental de blocos casualizados, com seis e sete repetições por tratamento, mantendo-se somente uma planta por vaso. Os experimentos com as cultivares Ravena e Santa Clara foram realizados em três períodos diferentes, nos meses de março, junho e novembro, enquanto que com as cultivares Colt e tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2 em apenas um período.

4.7 Avaliação em casa de vegetação da ação inibitória do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e do isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 no patossistema feijoeiro x *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Nos experimentos com o feijão foi utilizada a cultivar IAC 1850, considerada suscetível à Cff, e foram realizados tratamentos nas sementes de acordo com a metodologia descrita por Huang *et al.* (2007) com modificações. As sementes foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes em água destilada esterilizada e, as sementes foram imersas nas suspensões dos diferentes tratamentos de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, produto biológico comercial *B. subtilis* QST713, metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 diluído em

33% de acordo com Chacón-Orozco (2020) e produto químico tiofanato – metílico com fluazinam por 1 hora sob agitação a 250 RPM em temperatura ambiente. Em seguida, as sementes foram semeadas em vasos de 2,1 L contendo substrato orgânico Biomix®, colocando-se quatro sementes por vaso, sendo que após a germinação foi mantida somente uma planta. Quando as plantas atingiram o estágio de V2, foi realizada outra aplicação dos tratamentos, através da irrigação das raízes, seguindo-se a metodologia de Sun *et al.* (2023) com modificações. O substrato foi removido das raízes e em seguida realizou-se um ferimento com o auxílio de uma faca, visando facilitar a entrada de cada produto e, posteriormente, aplicou-se uma quantidade de 5 mL por planta da suspensão utilizada em cada tratamento. No tratamento com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 utilizou-se uma suspensão em água destilada autoclavada na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ e, para o produto químico fluazinam empregou-se a concentração de 1,5 L ha⁻¹. Após sete dias da aplicação, foi realizada a inoculação do fitopatógeno, no qual removeu-se o substrato das raízes e foi adicionada uma suspensão de 5 mL por planta também na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ da fitobactéria. O experimento contou com seis diferentes tratamentos com sete repetições cada, sendo uma planta por vaso considerada como uma repetição (Figura 9).

Figura 9 - Esquema do teste de patogenicidade em casa de vegetação para avaliação da ação inibitória do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e do isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 no patossistema feijoeiro x *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290



Os ensaios foram realizados em blocos casualizados, os sintomas da doença observados aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria e avaliados de acordo com a escala utilizada por Maringoni (2002), onde 0 = sem sintomas de doença; 1 = sintoma de mosaico nas folhas; 2 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% das folhas da planta); 5 = aproximadamente 25 % de folhas apresentam murchas e amarelecimento; 7 = aproximadamente 50% de folhas murchas, amarelecimento e necrose de folíolos, plantas com nanismo; 9 = aproximadamente 75% ou mais de folhas com murcha e/ou necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e ou morte da planta.

Através da utilização das médias obtidas nas avaliações da gravidade da doença, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner; Finney, 1997) e, em seguida, as AACPDs foram comparadas através do teste estatístico de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.8 Análise estatística

O programa estatístico utilizado foi o SISVAR 5.6 (Ferreira, 2019). O teste empregado para comparação das médias dos tratamentos foi de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25

O filtrado do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 sem diluição causou halos de inibição de medidas diferentes entre as linhagens de bactérias fitopatogênicas testadas, com destaque para redução de crescimento da linhagem de Cff IBSBF 1290. A partir destes resultados, foi realizada uma comparação do halo de inibição em relação ao período de crescimento de *X. szentirmaii* produtora do metabólito secundário PAM 25 no meio de cultura aos seis ou nove dias e com a presença (cultura líquida) ou não (filtrado) das células bacterianas (Tabela 1, Figura 10).

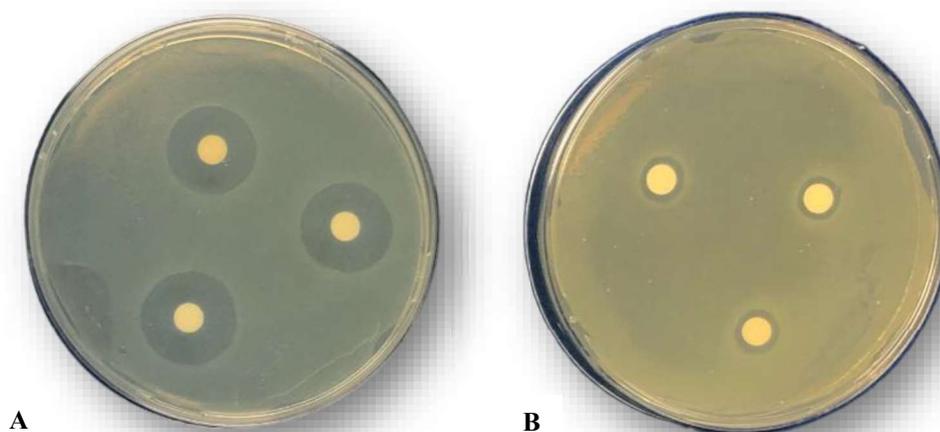
Tabela 1 - Avaliação do tamanho do halo de inibição de crescimento (centímetros) das fitobactérias produzido pela cultura líquida (não filtrado) e filtrado do metabólito *Xenhorhabdus szentirmaii* PAM 25 após crescimento do mesmo em seis dias e nove dias

Tratamentos	PAM 25 (6 dias) Filtrado	PAM 25 (6 dias) Cultura líquida	PAM 25 (9 dias) Filtrado	PAM 25 (9 dias) Cultura líquida
Cff	1,37 A	1,65 A	0	1,67 A
Xep	0,31 B	0,82 B	0	0,80 B

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott – Knott a 5% de significância

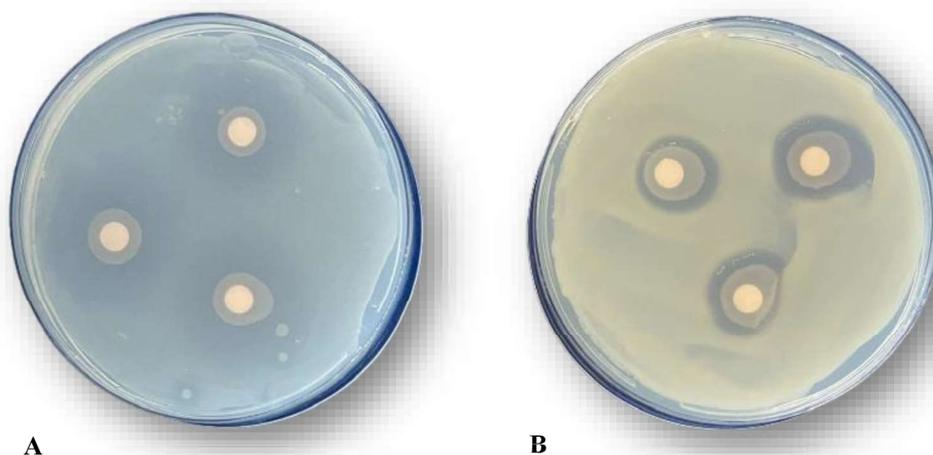
Os ensaios com a cultura líquida do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25, após seis dias de crescimento contra a linhagem de Cff IBSBF 1290 resultaram em halos de inibição de tamanhos muito próximos aos observados com o filtrado, sendo o melhor resultado obtido (Figura 11).

Figura 10 - Halos de inibição de crescimento das fitobactérias formados pela adição do filtrado do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 após seis dias de crescimento, frente às linhagens de (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e (B) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349.



Fonte: Macedo, 2020

Figura 11 - Halos de inibição de crescimento das fitobactérias formados pela adição da cultura líquida do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 após seis dias de crescimento, frente às linhagens de (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e (B) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349.

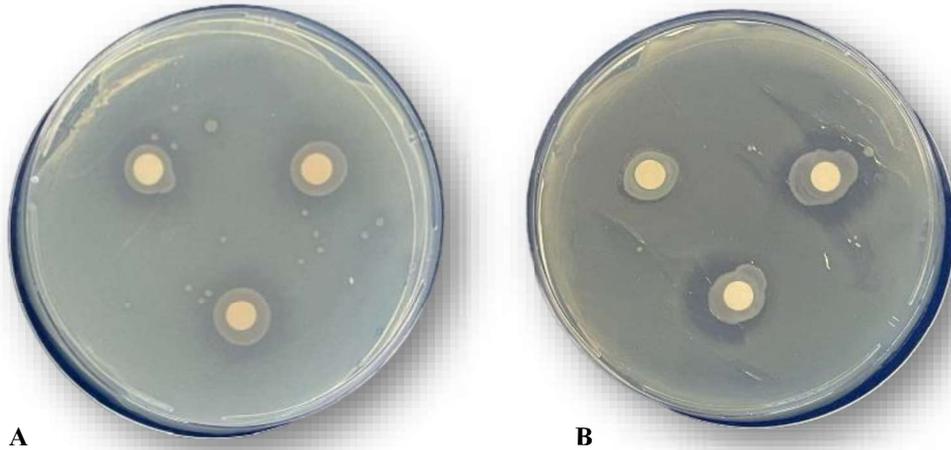


Fonte: Macedo, 2023

Com relação ao crescimento da bactéria *X. szentirmaii* por nove dias, halos de inibição foram observados somente na presença das células bacterianas, com resultados semelhantes aos registrados com crescimento bacteriano por um período de seis dias para as espécies Cff IBSBF 1290 e Xep IBSBF 2349 (Figura 12). Cabe salientar que na presença do filtrado e crescimento de nove dias não foram observados halos de inibição contra nenhuma das fitobactérias

avaliadas. Ou seja, um maior tempo de crescimento da célula bacteriana não resultou em aumento do tamanho do halo.

Figura 12 - Halos de inibição de crescimento das fitobactérias formados pela adição da cultura líquida do metabólito secundário de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 após nove dias de crescimento, frente às linhagens de (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e (B) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349



Fonte: Macedo, 2023

A partir dos resultados obtidos decidiu-se testar diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50%) dos extratos brutos de PAM 25 contra as linhagens de Cff IBSBF 1290 e Xep IBSBF 2349. Os melhores resultados de inibição foram observados na concentração de 50% com observação de halos com 1,28 cm contra a linhagem de Cff IBSBF 1290. Não foi verificada diferença significativa entre os halos observados para Xep IBSBF 2349 (0,10 a 0,21 cm) (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação dos halos de inibição de crescimento, em centímetros, de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e para *X. euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, utilizando-se diferentes concentrações do extrato filtrados de PAM 25.

Linhagens	Concentração (%)	Halo (cm)
Controle		0
Cff	10	0,63 B
	20	0,75 B
	30	0,92 B
	40	1,22 A
	50	1,28 A
Xep	10	0,1 A
	20	0,13 A
	30	0,14 A
	40	0,18 A
	50	0,21 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott – Knott a 5% de significância.

5.2 Avaliação da ação inibitória *in vitro* da linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 sobre o crescimento de fitobactérias

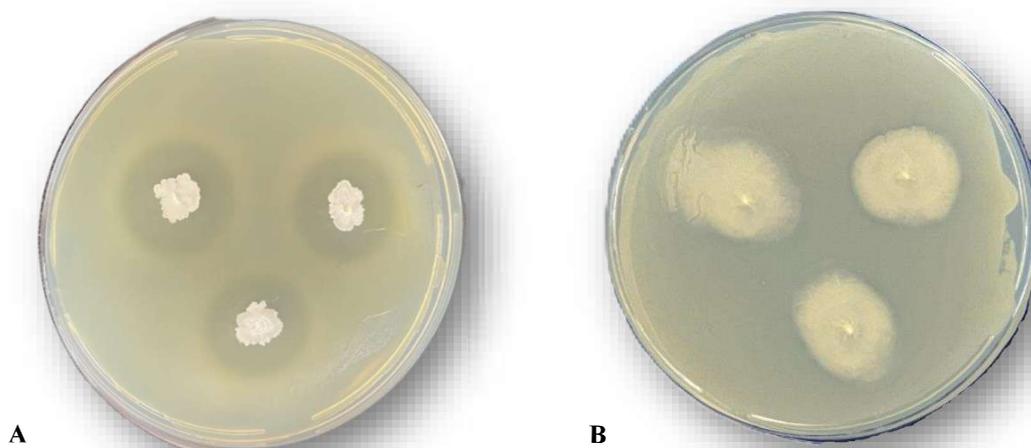
Nos testes *in vitro* da ação inibitória da linha de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 sobre as fitobactérias, o maior halo foi observado em Xep IBSBF 2349, diferindo significativamente da linhagem de Cff IBSBF 1290 (Tabela 3, Figura 13).

Tabela 3 - Avaliação do tamanho do halo de inibição de crescimento (em centímetros) produzido pela linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 frente à *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) IBSBF 1290 e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) IBSBF 2349.

Tratamento	Média
Controle	0
Cff	1,76 A
Xep	2,38 B

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Figura 13 - Halos de inibição formados pelo *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, sobre as linhagens de (A) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 e (B) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349



Fonte: Macedo, 2023

O resultado do ensaio, com halo de inibição de 2,38 cm sobre Xep IBSBF 2349 (Figura 13B), mostrou que a linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 possui capacidade antibacteriana.

5.3 Avaliação da ação inibitória dos metabólitos secundários de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e da linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 no patossistema tomateiro x *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Os resultados obtidos nos ensaios com a variedade de tomate Colt mostraram que o produto comercial com *B. subtilis* QST 713 reduziu a severidade da doença em 30,30%, seguido pelos tratamentos de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 e metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25, com 29,97% e 24,92%, respectivamente, não sendo observadas diferenças estatísticas entre esses (Tabela 4, Figura 14).

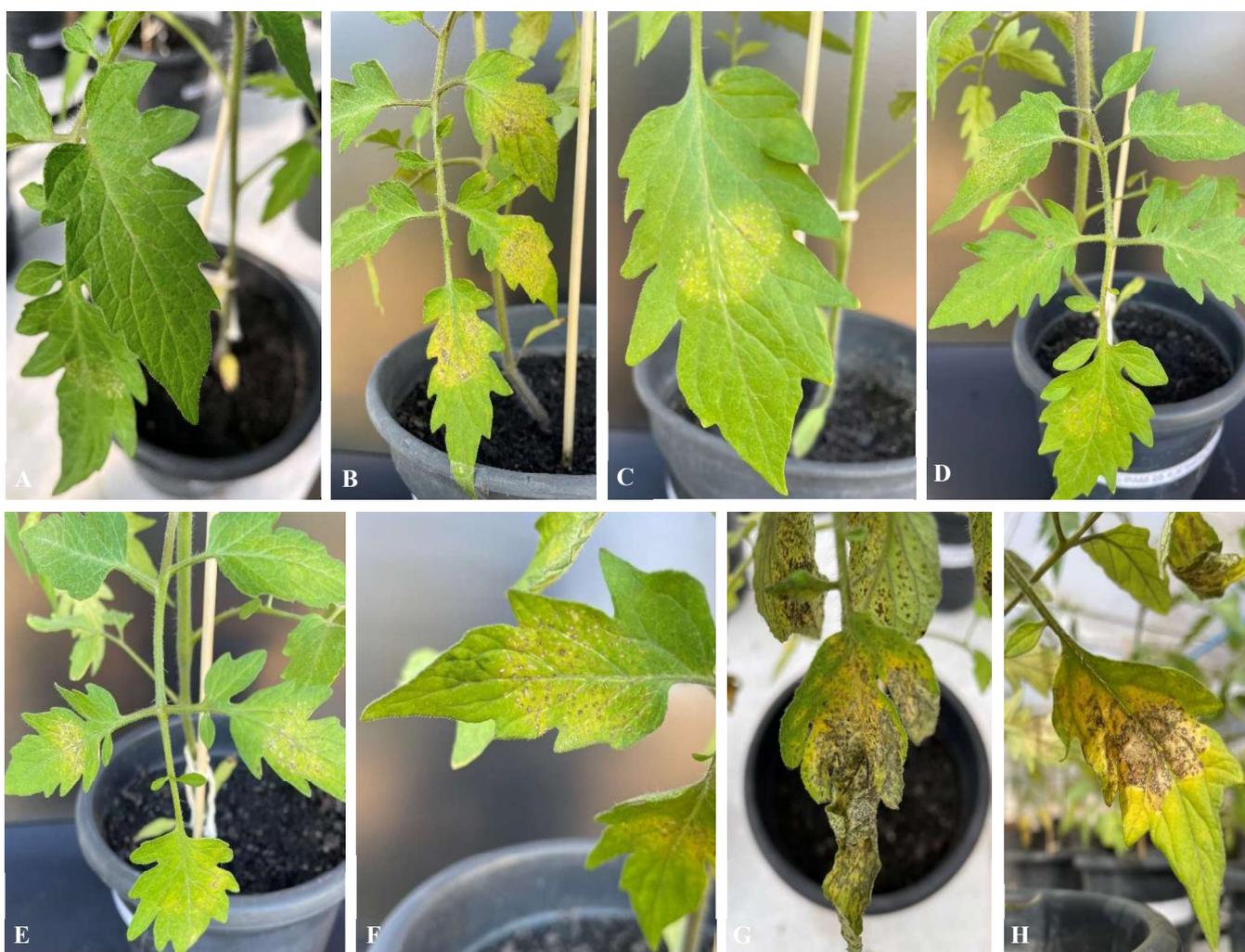
Os tratamentos com uma segunda aplicação do *B. subtilis* QST713 e do *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, após sete dias da inoculação do patógeno, resultou em redução da severidade em apenas 8% e 0,33% respectivamente. No tratamento com a segunda aplicação do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 não foi verificada redução da severidade.

Tabela 4 – Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar Colt pelo método de abrasão em casa de vegetação com os tratamentos *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, *Bacillus subtilis* QST713; segunda inoculação 7 D.A.I com *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, PAM 25, *Bacillus subtilis* QST713.

Tratamentos	Severidade (%)	Redução (%)
Controle negativo	0	0
Xep	61,87 B	-
Xep + <i>B. amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321	43,33 A	29,97
Xep + <i>B. amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321 7 D.A.I.	61,66 B	0,33
Xep + PAM 25	46,45 A	24,92
Xep + PAM 25 7 D.A.I.	70,00 B	-
Xep + <i>B. subtilis</i> QST713	43,12 A	30,30
Xep + <i>B. subtilis</i> QST713 7 D.A.I	56,66 B	8,00

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância

Figura 14 - Experimento com a cultivar de tomate Colt com inoculação pelo método de abrasão com os diferentes tratamentos sendo que todas as plantas foram previamente inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, (E) *Bacillus subtilis* QST713; segunda inoculação 7 D.A.I com (F) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (G) PAM 25, (H) *Bacillus subtilis* QST713, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).



No experimento com a cultivar de tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2, o produto químico oxiclreto de cobre foi o que apresentou a menor taxa de redução da doença, com apenas 18,21%, enquanto que no tratamento com fluazinam a redução foi de 71,12% (Tabela 5, Figura 15).

Tabela 5 - Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2 pelo método de abrasão em casa de vegetação com os tratamentos *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, filtrado do metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, *Bacillus subtilis* QST713, Fluazinam e Oxiclreto de Cobre.

Tratamentos	Severidade (%)	Redução (%)
Controle negativo	0	0
Xep	53,75 A	-
Xep + <i>B. amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321	29,16 B	45,73
Xep + PAM 25 cultura líquida	35,83 B	33,33
Xep + PAM 25 filtrado	31,79 B	39,92
Xep + <i>B. subtilis</i> QST713	45 C	16,27
Xep + Fluazinam	15,52 D	71,12
Xep + Oxiclreto de Cobre	43,95 C	18,21

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Nos tratamentos com o uso de agentes biológicos, os valores de redução da severidade da doença foram de 45,73% para a linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, 33,33% (cultura líquida) e 39,72% (filtrado) para o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 e de 16,27% para o produto comercial *B. subtilis* QST713 (Tabela 5).

Figura 15 - Experimento com a variedade de tomate rasteiro Petomech VF 1 & 2 pelo método de abrasão com os diferentes tratamentos aplicados preventivamente e posteriormente inoculadas com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349. (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, (E) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 filtrado, (F) *Bacillus subtilis* QST713, (G) Fluazinam, (H) Oxicloreto de cobre, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).



Fonte: Macedo, 2022

No primeiro experimento efetuado no mês de março com a cultivar Ravena, o melhor resultado de redução da severidade foi obtido no tratamento com o produto químico fluazinam com 85,30%. Os tratamentos com os microrganismos *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 e *B. subtilis* QST713 não diferiram entre si estatisticamente, com redução de severidade de 45,98% e 34,67%, respectivamente. O tratamento com o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 não apresentou diferença estatística significativa com relação ao controle positivo (Xep IBSBF 2349) apresentando um valor de severidade da doença de 9,47% (Tabela 6, Figura 16).

Tabela 6 - Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar tomate Ravena pelo método de aspersão em casa de vegetação nos meses de março, junho e novembro com os seguintes tratamentos: *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, *Bacillus subtilis* QST713 e Fluazinam.

Tratamentos	Março		Junho		Novembro	
	Severidade (%)	Redução (%)	Severidade (%)	Redução (%)	Severidade (%)	Redução (%)
Controle negativo	0	0	0	0	0	0
Xep	8,45 C	0	30,00 D	0	33,66 D	0
Xep + <i>B. amyloliquefaciens</i>	4,56 B	45,98	11,33 B	62,23	9,72 B	71,11
Xep + PAM 25	9,87 C	-	22,76 C	24,10	18,66 C	44,56
Xep + <i>B. subtilis</i> QST713	5,51 B	34,67	15,13 B	49,55	14,90 C	55,72
Xep + Fluazinam	1,24 A	85,30	5,25 A	82,50	2,43 A	92,77

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

No segundo experimento, no mês de junho, os valores de severidade aumentaram para 30% para o controle positivo Xep IBSBF 2349, que se diferenciou estatisticamente aos demais tratamentos: cultura líquida PAM 25 com 22,76%, produto biológico comercial *B. subtilis* QST713 com 15,13%, *Bacillus* IBSBF 3321 com 11,33% e fluazinam, que se diferiu estatisticamente dos demais com 5,25%. Cabe ressaltar que no tratamento com o produto químico comercial fluazinam a redução da severidade da doença foi de 82,50%, seguida pelo tratamento *Bacillus* IBSBF 3321 com 62,23%, e o produto *B. subtilis* QST713 com 49,55%. A cultura líquida de PAM 25 apresentou menor efeito de redução da severidade da mancha bacteriana, com 24,10%.

No terceiro experimento, realizado no mês de novembro, a severidade da doença no controle positivo Xep IBSBF 2349 aumentou para 33,66%. Observou-se um aumento da redução da severidade da doença nos tratamentos em que foram utilizados produtos de origem biológica, com destaque para os tratamentos com o *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 com 71,11%, seguido do *B. subtilis* QST713 com 55,72%, e o PAM 25 com 44,56%. No tratamento com o produto químico fluazinam a redução da severidade foi de 92,77% (Tabela 6).

Figura 16 - Experimento com a variedade de tomate Ravena com inoculação pelo método de aspersão com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, sendo que todas as plantas foram previamente inoculadas com (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 PAM 25, (F) Fluazinam, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).



Fonte: Macedo, 2023

Com relação aos ensaios com a variedade Santa Clara, no experimento realizado no mês de março, o tratamento com o PAM 25 diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos ao apresentar o maior valor de severidade, com 18,08%, indicando uma possível toxidez do produto. Os demais tratamentos não diferiram entre si, sendo que a maior porcentagem de redução da doença foi observada no tratamento com o produto químico comercial fluazinam com 93,48%, seguido pelos tratamentos com *Bacillus* IBSBF 3321, 51,04%, e *B. subtilis* QST713 com 12,44% (Tabela 7, Figura 17).

Tabela 7 - Avaliação das porcentagens de severidade e redução da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se a cultivar tomate Santa Clara pelo método de aspersão em casa de vegetação nos meses de março, junho e novembro de 2023 com os seguintes tratamentos: *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, *Bacillus subtilis* QST713 e Fluazinam.

Tratamento	Março		Junho		Novembro	
	Severidade (%)	Redução (%)	Severidade (%)	Redução (%)	Severidade (%)	Redução (%)
Controle negativo	0	0	0	0	0	0
Xep	7,68 B	0	18,94 C	0	29,10 C	0
Xep + <i>B. amyloliquefaciens</i>	3,76 B	51,04	8,45 B	55,37	6,56 A	77,45
Xep + PAM 25	18,08 C	-	9,66 B	38,42	15,84 B	45,55
Xep + <i>B. subtilis</i> QST713	6,72 B	12,44	11,66 B	49,01	12,00 B	58,74
Xep + Fluazinam	0,5 A	93,48	2,76 A	85,39	1,49 A	94,87

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância

Nos ensaios realizados no mês de junho, verificou-se que o valor de severidade no tratamento controle positivo foi de 18,94%, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, com 8,45% para os tratamentos com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713 valor de 11,66% e, para o tratamento com o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 com 9,66% e de apenas 2,76% para o tratamento com o produto químico fluazinam (Tabela 7).

No terceiro experimento, realizado no mês de novembro, o maior valor de severidade foi observado no tratamento com Xep IBSF 2349 (nota 29,10%) seguido pelos tratamentos com PAM 25 (nota 15,84%) e *B. subtilis* QST713 (nota 12%), não sendo observada diferença significativa entre eles. Excetuando-se o melhor resultado de redução no tratamento com o produto químico fluazinam (1,49%), o melhor resultado foi verificado no tratamento com o *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 com 6,56% (Tabela 7).

Figura 17 - Experimento com a variedade de tomate Santa Clara com inoculação pelo método de aspersão com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, sendo que todas as plantas foram previamente inoculadas com (A) Controle negativo, (B) Controle positivo *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, (F) Fluazinam, seguindo a escala diagramática de Duan *et al.* (2015).



Fonte: Macedo, 2023

Ao comparar as avaliações com relação aos meses de realização dos experimentos (março, junho e novembro) com as cultivares Ravena e Santa Clara, verificou-se valores de severidade maiores nos ensaios realizados nos meses de junho e novembro, ao mesmo tempo em que a redução da severidade também foi maior, principalmente para o tratamento com o

produto químico fluazinam, resultando em um menor avanço da doença, mostrando uma capacidade de ação do fungicida em relação ao seu uso em bactérias.

Com relação aos tratamentos com o uso de microrganismos entre os isolados *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 e *B. subtilis* QST713, o primeiro apresentou um potencial como agente de controle da mancha bacteriana do tomateiro devido a maior porcentagem de redução da severidade da doença em todos os experimentos realizados com as cultivares de tomate Ravena e Santa Clara, podendo ser utilizado como uma alternativa ao controle químico para a doença.

O metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 apresentou redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro nos ensaios realizados.

Para uma melhor análise de todos os resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados em casa de vegetação, a Tabela 8 apresenta um resumo dos dados obtidos com as variedades de tomate avaliadas e tratamentos realizados.

Tabela 8 - Avaliações da redução da severidade da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* IBSBF 2349 obtidas nos diferentes tratamentos e métodos de inoculação utilizados nas variedades de tomate Colt, rasteiro Petomech VF 1 & 2, Ravena e Santa Clara.

Tratamentos	Cultivares														
	Colt	Petomech VF 1 & 2		Ravena (março)		Ravena (junho)		Ravena (novembro)		Sta. Clara (março)		Sta. Clara (junho)		Sta. Clara (novembro)	
		Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)	Redução (%)
Controle negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Xep IBSBF 2349	61,88	53,75	8,44	30,00	33,66	7,67	18,94	29,10							
Xep + <i>B. amyloliquefaciens</i>	29,97	45,73	45,98	62,23	71,11	51,04	55,37	77,45							
Xep + PAM 25	24,92	33,33	↑	24,10	44,56	↑	38,42	45,55							
Xep + <i>B. subtilis</i> QST713	30,30	16,27	34,67	49,55	55,72	12,44	49,01	58,74							
Xep + Fluazinam	-	71,12	85,30	82,50	92,77	93,48	85,39	94,87							

0 = não houve a presença da doença; □ severidade da doença; (-) tratamento não realizado; □ Redução da severidade; ↑ aumento da severidade da doença ultrapassando o controle positivo

5.4 Avaliação em casa de vegetação (*in vivo*) da ação inibitória do metabólito PAM 25 e da linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321 no patossistema feijoeiro x *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

No primeiro ensaio, os tratamentos realizados com o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25, seguido por *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, apresentaram valores de AACPD de 36,07 e 35 respectivamente, enquanto que o tratamento com o produto químico comercial fluazinam resultou em uma AACPD de 41,78 (Tabela 9, Figura 18).

Tabela 9 – Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) dos três experimentos realizados para o controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 no feijoeiro IAC 1850 em casa de vegetação nos meses de março, maio e junho de 2024 com os seguintes tratamentos: *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, cultura líquida do metabólito secundário *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, *Bacillus subtilis* QST713 e Fluazinam.

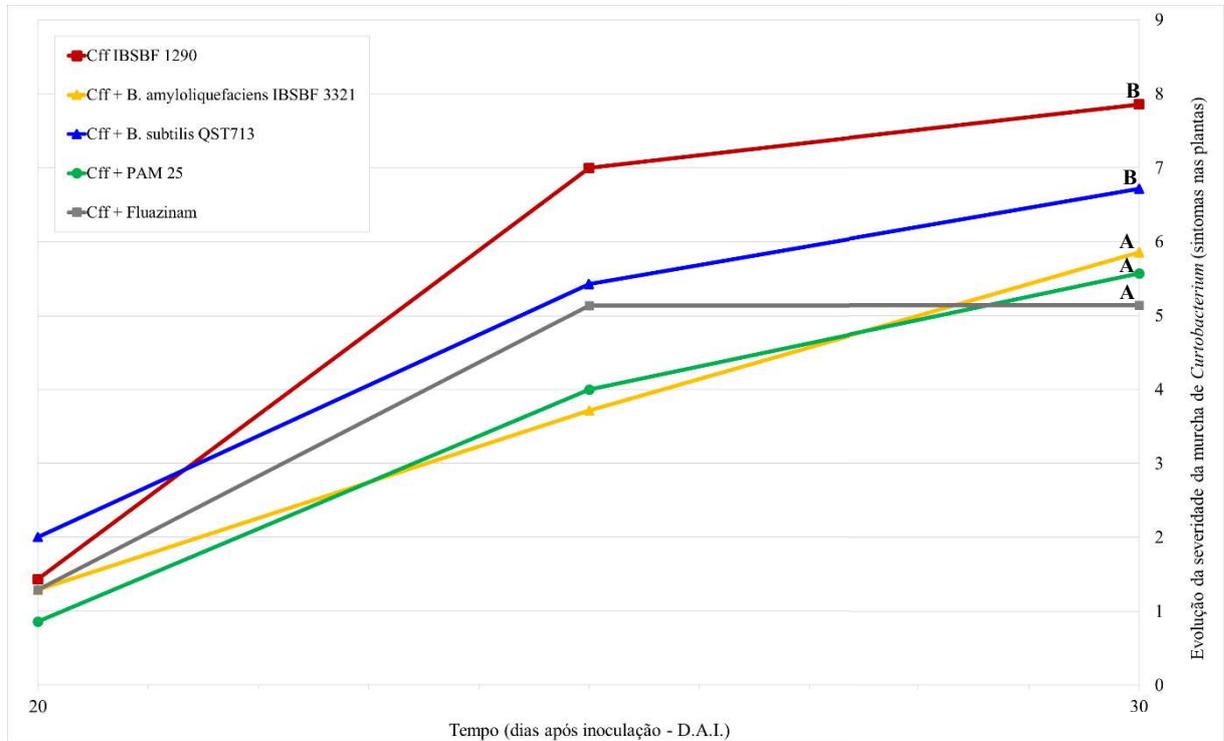
Tratamento	Redução (%) *	AACPD Experimento 1	AACPD Experimento 2	AACPD Experimento 3
Controle negativo	0	0	0	0
Cff	-	58,21 B	63,07 B	58,92 B
Cff + <i>B. amyloliquefaciens</i> IBSBF 3321	30	35,00 A	40,71 A	38,57 A
Cff + <i>B. subtilis</i> QST713	27,5	48,92 B	37,14 A	37,85 A
Cff + PAM 25	38	36,07 A	33,92 A	27,85 A
Cff + Fluazinam	89	41,78 A	30,00 A	37,85 A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Scott-Knott a 5% de significância

* Porcentagem de redução dos sintomas da doença calculadas a partir da média dos três experimentos

Nas avaliações efetuadas aos 25 DAI seguindo a escala diagramática de Maringoni *et al.* (2002), os tratamentos realizados com o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 e com a linhagem de *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 resultaram em nota 4 na escala da evolução dos sintomas da doença, e aos 30 DAI as notas aumentaram para aproximadamente 6. Nos tratamentos com os produtos comerciais (fluazinam e *B. subtilis* QST 713), as notas foram de aproximadamente 5 aos 25 DAI e de aproximadamente 7 para o agente biológico aos 30 DAI. O produto fluazinam manteve a mesma nota 5 aos 30 DAI (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Evolução dos sintomas causados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no **Experimento 1** com leituras aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria nos tratamentos com *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *Bacillus subtilis* QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam, utilizando a escala diagramática de acordo com Maringoni (2002).



Obs: As letras indicam o resultado do teste estatístico de Scott-Knott a 5% de significância (Tabela 9)

Figura 18 - Experimento em feijoeiro com inoculação nas raízes com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no mês de março. (A) Testemunha, (B) Controle positivo *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito PAM 25, (F) Fluazinam.



Fonte: Macedo, 2024

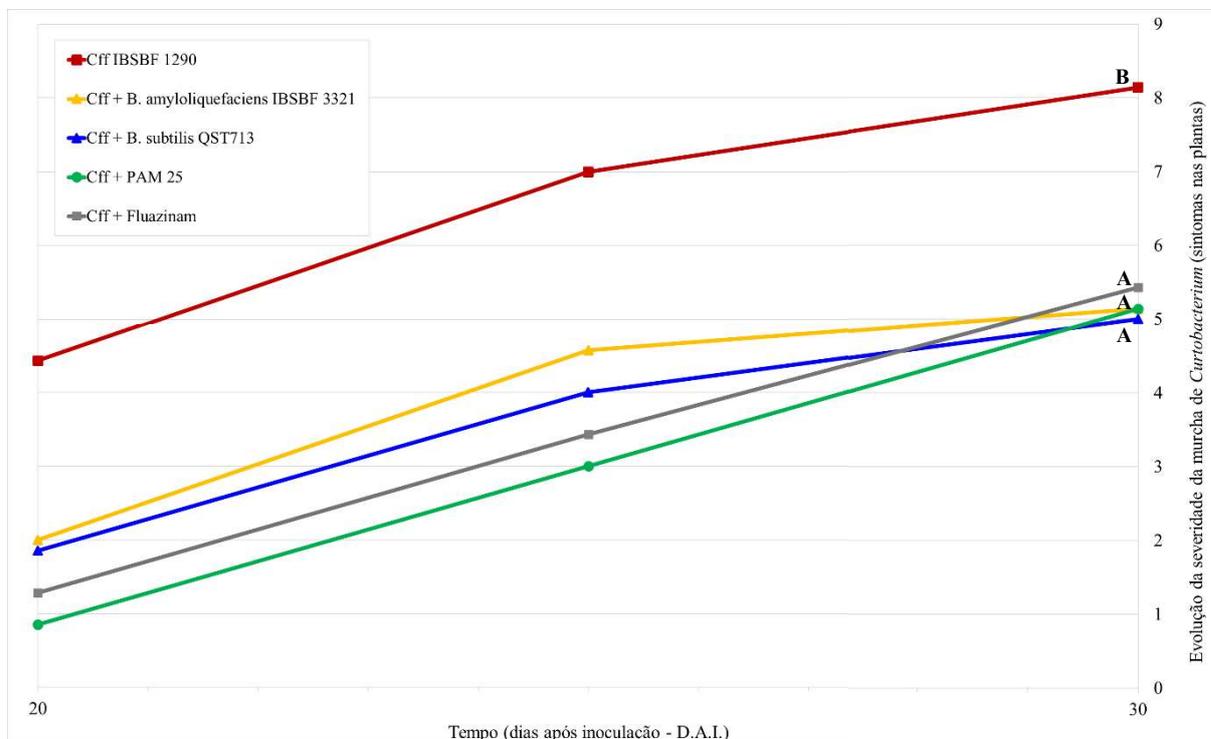
No segundo experimento, realizado no mês de maio, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na AACPD entre os diferentes tratamentos. Especificamente, os tratamentos que utilizaram *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713, o metabólito

PAM 25 e o fungicida fluazinam mostraram uma redução significativa na área abaixo da curva quando comparados ao tratamento de controle positivo, que utilizou *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290 (Tabela 9).

O metabólito PAM 25 apresentou a menor área abaixo da curva do progresso da doença a partir dos 20 dias após a inoculação (D.A.I.), seguido do tratamento químico fluazinam, *B. subtilis* QST713 e do *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 (Gráfico 2).

Durante o experimento, os tratamentos com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam mantiveram uma área abaixo da curva de progresso da doença menor, apresentando as notas de severidade muito próximas entre esses tratamentos. No entanto, o produto químico fluazinam apresentou uma leve evolução da severidade da doença superior aos outros, mesmo sem diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Gráfico 2 - Evolução dos sintomas causados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no **Experimento 2** com leituras aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria nos tratamentos com *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *Bacillus subtilis* QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam, utilizando a escala diagramática de acordo com Maringoni (2002).



No terceiro experimento, realizado no mês de junho, o comportamento dos tratamentos com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713, o metabólito PAM 25 e o fungicida

fluazinam foram semelhantes, e demonstraram uma redução significativa na área abaixo da curva em comparação ao tratamento com Cff IBSBF 1290 (Tabela 9).

Entre os tratamentos testados, o metabólito PAM25 mostrou a menor área abaixo da curva de progresso da doença quando comparado ao tratamento com Cff IBSBF 1290. Em seguida, os tratamentos com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713 e fluazinam também apresentaram áreas menores, indicando uma evolução menos severa da doença (Gráfico 3, Figura 19).

Gráfico 3 – Evolução dos sintomas causados por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no **Experimento 3** com leituras aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação da fitobactéria nos tratamentos com *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *Bacillus subtilis* QST713, metabólito PAM 25 e fluazinam, utilizando a escala diagramática de acordo com Maringoni (2002).

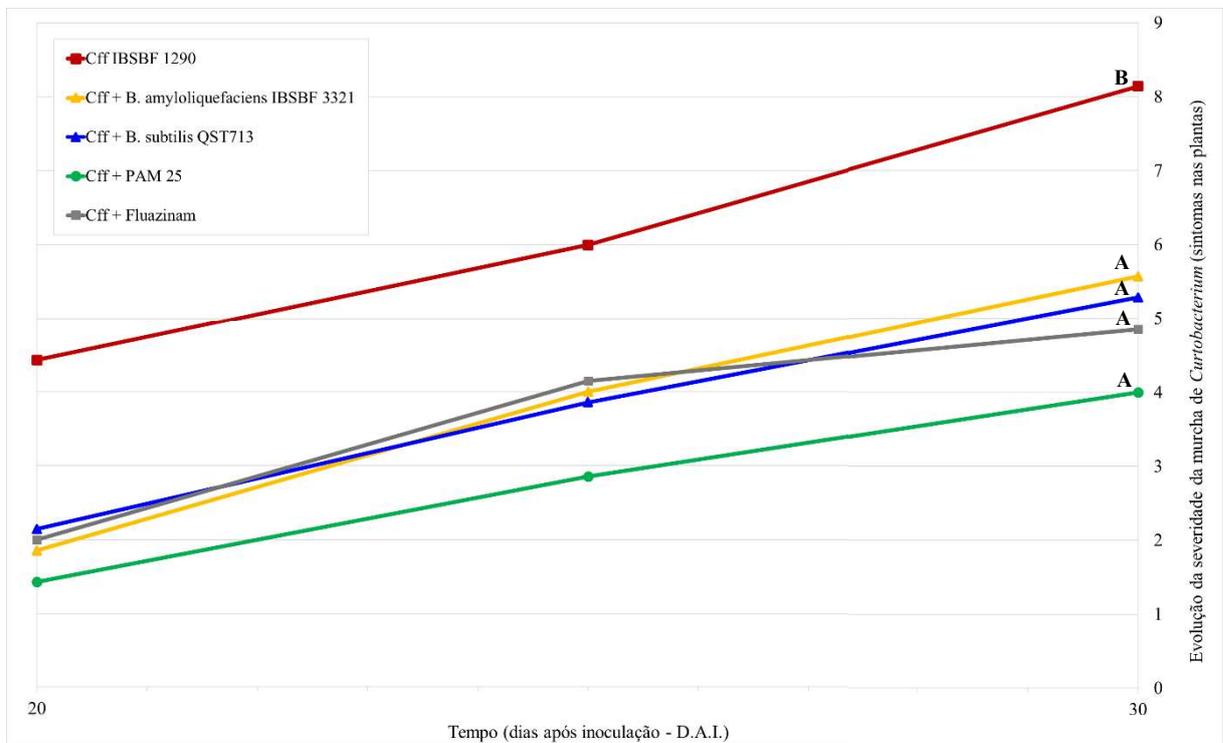


Figura 19 - Experimento em feijoeiro com inoculação nas raízes com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, realizado no mês de junho. (A) Testemunha, (B) Controle positivo *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* IBSBF 1290, (C) *Bacillus amyloliquefaciens* IBSBF 3321, (D) *Bacillus subtilis* QST713, (E) metabólito PAM 25, (F) Fluazinam.



Fonte: Macedo, 2024

A evolução da doença causada por Cff IBSBF 1290 foi semelhante nos tratamentos com metabólito PAM 25, *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713 e fluazinam durante

os experimentos dois e três, quando a temperatura mais amena pode ter influenciado o desempenho dos tratamentos contra a bactéria Cff IBSBF 1290.

Os experimentos demonstraram que os tratamentos avaliados para o controle da murcha de *Curtobacterium* são promissores. Entre eles, o metabólito PAM 25 se destacou, mostrando uma evolução da doença menor, seguido pelos tratamentos com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321, *B. subtilis* QST713 e o produto químico fluazinam. Isso indica que o metabólito PAM 25 pode ser uma opção especialmente eficaz no manejo da Cff na cultura do feijão.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do teste *in vitro* mostraram que o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 causou inibição de crescimento da fitobactéria Cff IBSBF 1290, tanto na condição de cultura líquida quanto de filtrado, ressalta-se que o melhor resultado foi verificado com crescimento da NEP pelo período de seis dias. Dados similares também foram observados em testes realizados para o controle do fungo *Cryphonectria parasitica*, causador do cancro-do-castanheiro. O cultivo da bactéria *X. szentirmaii* por um período de crescimento de seis dias também resultou na inibição de 100% do desenvolvimento daquele fungo (Cimen et al., 2021). Na realização de testes *in vitro* para o controle de *Erwinia amylovora*, causadora do fogo bacteriano na cultura da maçã, Böszörményi *et al.* (2009) utilizaram diferentes bactérias simbioses dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* e verificaram que *X. szentirmaii* se destacou entre as demais por apresentar maior halo de inibição de crescimento, com aproximadamente 2,5 cm.

Com relação aos experimentos realizados com diferentes concentrações do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 (10%, 20%, 30%, 40% e 50%) testando-se as duas fitobactérias, verificou-se que o halo de inibição aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração. Cimen *et al.* (2021) também avaliaram a capacidade inibitória de metabólito de *X. szentirmaii* sobre o fungo *Fusarium oxysporum* e observaram que quanto maior a concentração, maior era a inibição sobre o crescimento do fungo, e nesse caso, a maior concentração testada (50%) ainda não foi eficiente no controle do fungo. Ao realizarem o mesmo teste com *Rizoctonia solani* em testes *in vitro*, os autores verificaram que a concentração de 50% inibiu o crescimento do fungo em 100%, ressaltando o uso do metabólito sobre fungos fitopatogênicos.

Chacón-Orozco *et al.* (2020) também utilizaram o filtrado obtido a partir do crescimento de *X. szentirmaii* PAM 25 por um período de seis dias inibiu 100% o crescimento micelial de

Sclerotinia sclerotiorum quando utilizado na concentração de 33%, porém, ao utilizar o mesmo metabólito com o período de crescimento da bactéria por nove dias, a inibição do fungo ficou abaixo de 80%.

Os testes realizados *in vitro* com a bactéria *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 mostraram halo de inibição de 2,38 cm sobre Xep IBSBF 2349, indicando a capacidade antibacteriana do *Bacillus*, assim como o observado para outra linhagem dessa mesma espécie (*B. amyloliquefaciens* F9) utilizada para controlar *X. citri* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico, com halos de inibição variando de um a três centímetros (Wang et al., 2022).

Outros trabalhos com diversas espécies de bactérias do gênero *Bacillus* mostraram o potencial desse gênero para o manejo de doenças na agricultura. Monteiro *et al.* (2005) analisaram o uso de diferentes espécies de *Bacillus* contra nove linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas e verificaram que os isolados *B. megaterium* e *B. subtilis* apresentaram maior atividade antimicrobiana. As espécies de *B. subtilis* e *B. licheniformis* também se mostraram eficientes em testes de antagonismo para controlar Cff, com halos de inibição maiores que dois e três centímetros e que, em alguns casos, a inibição de crescimento foi total (Leão et al., 2016).

Bactérias do gênero *Bacillus* possuem capacidade de ação antagonica direta e indireta, indicando seu potencial para uso agrícola devido à capacidade da produção de inúmeros compostos incluindo lipopeptídeos, que interferem nas estruturas biológicas da membrana celular do fitopatógeno tornando seu uso muito interessante no controle de doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, além de insetos, ácaros e nematoides fitopatogênicos (Penha et al., 2020; Wang et al., 2022).

Com relação aos testes em casa de vegetação com plantas de tomate, os ensaios realizados pelo método de abrasão mostraram uma alta taxa de severidade da mancha bacteriana do tomateiro. Essa taxa também pode ser explicada em relação a metodologia utilizada que, segundo Rodrigues *et al.* (2017), a técnica por abrasão pode causar um efeito facilitador para entrada das células bacterianas, ocasionando melhores condições para penetração e colonização nas folhas. No trabalho realizado com o tomate rasteiro cultivar Petomech VF 1 & 2, verificou-se baixa porcentagem de redução da severidade da doença no tratamento com oxiclreto de cobre (500 g.kg⁻¹ de ingrediente ativo), considerado produto químico. Essa falta de eficiência do cobre também foi observada no trabalho desenvolvido por Carmo; Macagan; Carvalho, (2001) para o controle da mancha bacteriana no pimentão, causada pela espécie *X. vesicatoria*. Nesse estudo, foram efetuadas aplicações de oxiclreto de cobre na concentração de 2,4 g. L⁻¹ de ingrediente ativo em condições de campo e os autores observaram variação na eficácia do

produto, podendo estar relacionada a diversos fatores entre eles o clima, que, em altas temperaturas e precipitações, favorecem o desenvolvimento da doença. Os autores levantaram outras hipóteses como o produto pode ser lavado das folhas devido às chuvas; pode ocorrer desenvolvimento de resistência do patógeno às diversas aplicações do produto, além do local de aplicação do cobre nas folhas. A literatura ainda traz informações de que o uso frequente de aplicações foliares desse elemento podem tornar algumas populações de *Xanthomonas* altamente tolerantes ou até resistentes (Klein-Gordon et al., 2021; Liao et al., 2018). No presente estudo, os melhores resultados de redução da severidade da doença nos diferentes experimentos foram observados no tratamento com fluazinam, verificando-se até 94,87%. Itako et al. (2014) realizaram um trabalho visando o controle de Xep em plantas de tomate e observaram que o fungicida também controlou a bactéria, corroborando com os resultados observados no nosso estudo. De acordo com relatos de literatura, o fungicida fluazinam é conhecido por causar um efeito protetor, pois após ser absorvido, se distribui nos tecidos da planta, penetrando a cutícula e entrando no tecido foliar tratado, com translocação mínima na planta (Schepers et al., 2018; Younes; Dawood; Wardany, 2020). Segundo Monteiro et al (2024), o efeito bactericida do fluazinam pode ser devido à presença de cloro e flúor em sua composição.

Após os resultados obtidos pelo método de inoculação por abrasão, optou-se por utilizar o método de aspersão para os testes com as variedades de tomateiro Ravena e Santa Clara, ressaltando ser esse método o mais próximo às condições de campo. Os experimentos foram realizados nos meses de março, junho e novembro de 2023 e um fator que pode ter influenciado a alta na severidade da doença observada pode estar relacionado à temperatura. Segundo o CEPAGRI/UNICAMP (2023), as temperaturas no mês de março variaram entre 16,2 °C e 33°C, ocasionando em melhores condições para o desenvolvimento da fitobactéria Xep. Já no mês de junho as temperaturas variaram entre 12 °C e 28,4 °C, e o mês de novembro, entre 13,8 °C e 34,1 °C. Em estudo realizado para avaliar o crescimento das quatro diferentes espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana nas temperaturas de 20 °C, 25 °C e 30 °C, verificou-se que inoculações com Xep resultaram no aparecimento dos primeiros sintomas após sete dias na temperatura de 30 °C e, de oito dias a 20° C, porém observaram que a fitobactéria se mostrou mais agressiva em temperaturas próximas a 30 °C (Araújo et al., 2011). Abrahamian et al. (2021a) também avaliaram o período de incubação de Xep nos períodos mais frios e quentes do ano na região central da Flórida, em casa de vegetação. Eles observaram que as lesões apareceram a partir dos dez dias após a inoculação da fitobactéria no mês de outubro, onde as temperaturas oscilaram de 16°C a 28°C, e foi relatado que, em um curto período de

altas temperaturas a doença pode aumentar significativamente, indicando a influência da temperatura no acúmulo populacional da bactéria, mas que em condições desfavoráveis, levam ao atraso no seu desenvolvimento.

O clima frio e o estresse causado pelo excesso e/ou falta de água, também são fatores influenciadores na bioquímica da planta, que regulam a abertura dos estômatos. Ressalta-se, também, que existem espécies de *Xanthomonas* que podem ser resistentes a condições desfavoráveis para seu desenvolvimento, além de sobreviverem em restos culturais por até dois anos nas regiões de clima temperado e por meses em locais de clima quente e alta umidade (González-García et al., 2021; Jones et al., 1986).

Os tratamentos realizados com *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 se mostraram eficientes na redução da severidade da doença causados por Xep IBSBF 2349. Há outros trabalhos realizados visando o controle biológico de Xep, tal como o desenvolvido por Godinho (2018), que utilizou bactérias do gênero *Bacillus* visando o controle biológico da mancha bacteriana no tomate em casa de vegetação. Em dois ensaios realizados entre os meses de dezembro e janeiro foi observada redução da severidade de Xep em até 79,02%. Silva (2019) também testou o potencial de biocontrole de *Bacillus velezensis* sobre Xep com o uso comparado a produtos químicos e dois tipos de aplicação (via solo e foliar) e verificou que o controle da mancha bacteriana foi efetivo nos dois métodos, não diferindo estatisticamente dos tratamentos químicos. De acordo com Wang *et al.* (2022), compostos antibacterianos de uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* F9 foram utilizados para o controle do cancro cítrico, em condições de casa de vegetação. Segundo os autores, esses compostos estão relacionados a três tipos de lipopeptídeos e possuem uma capacidade de reduzir de maneira muito expressiva a doença nas folhas, podendo ser utilizados no controle de outras doenças causadas por diferentes espécies de *Xanthomonas*.

Em relação ao trabalho realizado com feijoeiro em casa de vegetação, os tratamentos com os agentes biológicos *B. amyloliquefaciens* IBSBF 3321 e *B. subtilis* QST713, bem como o tratamento com o metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25, mostram potencial de controle da doença causada por Cff. Em experimento de controle biológico utilizando duas diferentes linhagens de *B. cereus*, DFs093 e DFs769, Corrêa *et al.* (2014) verificaram redução da severidade da doença quando realizado o tratamento de sementes de feijão com essas bactérias. Resultados semelhantes foram observados em experimento com tratamento de sementes de feijão, bem como aplicação do mesmo agente de biocontrole na planta, com redução da incidência da doença em 79% (Munene, 2023).

Como esperado, o tratamento com produto químico fluazinam mostrou um efeito sobre o avanço da doença na planta de feijão, principalmente no final do ciclo do experimento. Entretanto, Harding *et al.* (2019) realizaram estudos sobre o efeito dos produtos químicos, incluindo o fluazinam sobre esta fitobactéria, e concluíram que Cff é capaz de produzir um biofilme, conferindo assim resistência ao uso destes produtos.

Todos esses trabalhos demonstram a eficiência do emprego de controle biológico para Xep e Cff, o que pode ser uma alternativa extremamente útil em substituição aos produtos químicos, contribuindo com a sustentabilidade do meio ambiente e saúde do homem. Cabe ressaltar que este trabalho representa o primeiro estudo de utilização do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 no controle de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas.

7 CONCLUSÃO

- Os testes *in vitro* se mostraram eficientes na avaliação da ação inibitória do metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25, com destaque no controle de Cff IBSBF 1290;
- O tempo de crescimento de seis ou nove dias nos tratamentos com cultura líquida ou filtrado de *X. szentirmaii* produtora do metabólito secundário PAM 25 influenciou na ação inibitória do crescimento das fitobactérias.
- Os resultados (*in vitro*) com filtrados produzidos por *X. szentirmaii* PAM 25 em diferentes concentrações indicaram que o efeito é maior quando há uma concentração mais elevada do metabólito;
- O metabólito secundário de *X. szentirmaii* PAM 25 e a linhagem de *B. amyloquefaciens* IBSBF 3321 se mostraram eficientes no controle da mancha bacteriana do tomateiro e na murcha de *curtobacterium* em feijoeiro;
- A linhagem de *B. amyloquefaciens* IBSBF 3321 apresentou maior eficiência no controle da mancha bacteriana do tomateiro e da murcha de *curtobacterium* em feijoeiro quando comparado ao produto biológico comercial *B. subtilis* QST 713; e
- O produto químico comercial fluazinam foi o que apresentou o melhor resultado de redução de incidência das doenças causadas por de Xep IBSBF 2349 e Cff IBSBF 1290.

8 REFERÊNCIAS

- ABRAHAMIAN, Peter et al. **Dynamics and spread of bacterial spot epidemics in tomato transplants grown for field production.** *Plant Disease*, v. 105, n. 3, p. 566-575, 2021a.
- ABRAHAMIAN, Peter et al. **Epidemiology, diversity, and management of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 105, n. 16-17, p. 6143-6158, 2021b.
- AGRIOS, G. N. (ED.). *Control of Plant Diseases*. Em: **Plant Pathology 5ª edição**. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005. p. 295–357.
- AKHURST, R. J. **Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*.** *Microbiology*, v. 121, n. 2, p. 303-309, 1980.
- ARAÚJO, E. R. et al. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. In: **III International Symposium on Tomato Diseases 914**. p. 39-42. 2011
- ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. **Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil.** *Plant Pathology*, v. 66, n. 1, p. 159-168, 2017.
- BAUCHET, Guillaume; CAUSSE, Mathilde. **Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives.** *Genetic diversity in plants*, v. 8, p. 134-162, 2012.
- BERNAL, R. F.; BERGER, R. D. **The spread of epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper in the field.** *Journal of Phytopathology*, v. 144, n. 9-10,
- BETTIOL, W. Situação do controle biológico no Brasil. In: Simpósio sobre controle biológico na agricultura (COBIAGRI), 2022, Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis: UFSC, 2022. p. 9-14.
- BETTIOL, W.; Ghini, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; Krauss, U.; STEFANOVA, M. & COTES PRADO, A. M. Controle Biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R. B. (Eds.) **Controle Microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba. FEALQ, 2008. p. 303-327.
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo AB. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BÖSZÖRMÉNYI, E. et al. **Isolation and activity of *Xenorhabdus antimicrobial* compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n. 3, p. 746-759, 2009.
- BRACHMANN, Alexander O. et al. **Triggering the production of the cryptic blue pigment indigoidine from *Photorhabdus luminescens*.** *Journal of biotechnology*, v. 157, n. 1, p. 96-99, 2012.

BRACHMANN, Alexander O. et al. **Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii***. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 12, p. 1830-1832, 2006.

CARMO, Margarida Goréte Ferreira do; MACAGNAN, Dirceu; CARVALHO, Aldir de Oliveira de. **Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxiclureto de cobre**. *Horticultura Brasileira*, v. 19, p. 342-347, 2001.

CAWOY, Hélène et al. **Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens***. *Microbial biotechnology*, v. 8, n. 2, p. 281-295, 2015.

CEPAGRI. Unicamp. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <https://www.cpa.unicamp.br/graficos>. Acesso em: 10 jul. 2023.

CEPEA. Pib do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx#:~:text=Pesquisadores%20do%20Cepea/CNA%20indicam,PIB%20do%20Pa%C3%ADs%20em%202023>. Acesso em: 5 nov. 2023.

CHACON-OROZCO, Julie G. et al. **Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. against the soybean pathogenic *Sclerotinia sclerotiorum***. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 20649, 2020.

CICHE, Todd A. et al. **Photobactin: a catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 nematodes**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4706-4713, 2003.

CIMEN, Harun et al. **Antifungal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species against various fungal phytopathogens and identification of the antifungal compounds from *X. szentirmaii***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 5517-5528, 2021.

COLLINS, M. D.; JONES, D. **Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov.** *Journal of General Microbiology*, v. 129, n. 11, p. 3545-3548, 1983.

CONAB (Brasil). COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Tomate: análise dos indicadores da produção e comercialização no mercado mundial, brasileiro e catarinense**. Brasília, DF. 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/institucional/publicacoes/compendio-de-estudos-da-conab>. Acesso em: 23 maio 2023.

CONAB (Brasil). COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **8º Levantamento - Safra 2022/23: Tabela de dados - Produção e balanço de oferta e demanda de grãos**. Brasília, DF. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 23 maio 2023.

CONSTANTIN, E. C. et al. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 792-806, 2016.

CORRÊA, Bianca Obes; SCHAFER, Jaqueline Tavares; MOURA, Andrea Bittencourt. **Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean**. *Biological Control*, v. 72, p. 71-75, 2014.

DA SILVA, Alice Oliveira; DOS SANTOS, Flávio. **A modernização da agricultura e seus impactos no campo: uma análise sobre a disseminação dos agrotóxicos em alagoas (2012-2021)**. UÁQUIRI-Revista do Programa de Pós Graduação em Geografia da Universidade Federal do Acre, v. 5, n. 1, 2023.

DE MELO, Thiago Anchieta; NASCIMENTO, Ingrid Tayane Vieira da Silva do; SERRA, Ilka Márcia Ribeiro de Souza. **O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas**. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, p. e18110917817-e18110917817, 2021.

DE VOS, Paul et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2011.

DERZELLE, Sylviane et al. **Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens***. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 8, p. 3780-3789, 2002.

DOIDGE, Ethel M. **A tomato canker**. *Ann. Appl. Biol.*, v. 7, n. 4, p. 407-30, 1921.

DOWSON, W. J. **The generic name of the Gram positive bacterial plant pathogens**. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 25, n. 3, p. 311-314, 1942.

DREYER, J. et al. ***Xenorhabdus khoisanae* SB10 produces Lys-rich PAX lipopeptides and a Xenocoumacin in its antimicrobial complex**. *BMC microbiology*, v. 19, p. 1-11, 2019.

DUAN, Junjie; ZHAO, Baimei; WANG, Yuqing; YANG, Wencai. **Development and validation of a standard area diagram set to aid estimation of bacterial spot severity on tomato leaves**. *European Journal of Plant Pathology*, v. 142, p. 665-675, 2015.

EMBRAPA (Brasil). **História da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia>. Acesso em: 25 maio 2023.

FAOSTAT (Itália). **Crops and livestock products**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 20 maio 2023.

FERREIRA, Daniel Furtado. **SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs**. *revista brasileira de biometria*, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, (2), 185-196, 2010.

- FILHO, Roberto Lanna; FERRO, Henrique Monteiro; PINHO, RSC de. **Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis***. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- FODOR, A. et al. **New perspectives of *Xenorhabdus* antibiotics research**. IOBC/WPRS **Bulletin: Insect pathogens insect parasitic nematodes**. Ales, p. 157-164, 2008.
- FODOR, András et al. **Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria in vivo**. J. Microbiol. Antimicrob, v. 2, p. 36-46, 2010.
- FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria–Nematode Symbiosis. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. New Jersey: Cabi Publishing, 2002. Cap.3 p. 57-74.
- FORST, S.; NEALSON, K. **Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.** American Society for Microbiology, v. 60, n. 1, p. 21–43, 1996.
- GARRITY, George M.; JONES, Dorothy; KRIEG, Noel R.; LUDWIG, Wolfgang; RAINEY, Fred A.; SCHLEIFER, Karl-Heinz; WHITMAN, William B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**. 2. ed. Springer, 2009. v. 3, p. 21-128
- GAUTAM, S. et al. **Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis***. Microbial pathogenesis, v. 130, p. 196-203, 2019.
- GODINHO, Moysa Carvalho. **Biocontrole da mancha e murcha bacteriana do tomateiro por bactérias endofíticas**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- GOMES, Cecília Siman. **Impactos da expansão do agronegócio brasileiro na conservação dos recursos naturais**. Cadernos do Leste, v. 19, n. 19, 2019.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, Yolanda et al. Induction of stress tolerance in crops by applying nanomaterials. In.: **Nanotechnology in Plant Growth Promotion and Protection: Recent Advances and Impacts**, p. 129-169, 2021.
- GUALTIERI, Maxime; AUMELAS, André; THALER, Jacques-Olivier. **Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila***. The Journal Of Antibiotics, v. 62, n. 6, p. 295-302, 2009.
- HALLMANN, J. et al. **Bacterial endophytes in agricultural crops**. Canadian journal of microbiology, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.
- HARDING, Michael et al. **Improved methods for treatment of phytopathogenic biofilms: metallic compounds as anti-bacterial coatings and fungicide tank-mix partners**. Molecules, v. 24, n. 12, p. 2312, 2019.
- HARVESON, Robert M. **The Multicolored Bacterium**. APS Feature, 2013. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/pages/bacterium.aspx>

HAVERSON, Robert M.; SCHWARTZ, Howard F.; URREA, Carlos A.; YONTS, Carlos Dean. **Bacterial Wilt of Dry-Edible Beans in the Central High Plains of the U.S.: Past, Present, and Future.** *Plant Disease*, v. 99, n. 12, p. 1665-1677, 2015.

HEDGES, Florence. **A Bacterial Wilt Of The Bean Caused By *Bacterium flaccumfaciens* Nov. Sp.** *Science*, v. 55, n. 1425, p. 433-434, 1922.

HEDGES, Florence. **Bacterial wilt of Beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*.** *Phytopathology*, v. 16, n. 1, p. 1-22, 1926

HERT, A. P., ROBERTS, P. D., MOMOL, M. T., MINSAVAGE, G. V., Tudor-Nelson, S. M., & Jones, J. B. **Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains.** *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n.7, 2005.

HU, Kaiji et al. **A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae).** *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 14, n. 13, p. 4677-4681, 2006.

HU, Kaiji; LI, Jianxiong; WEBSTER, John M. **Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes.** *Nematology*, v. 1, n. 5, p. 457-469, 1999.

HU, Xiaojia et al. **Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations.** *Canadian journal of microbiology*, v. 57, n. 7, p. 539-546, 2011.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; HSIEH, T. F. **Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*.** *Crop Protection*, v. 26, n. 7, p. 1055-1061, 2007.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: estatística da produção agrícola.** 2024. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2024_abr.pdf. Acesso em: 07 junho 2024.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. Doenças do tomateiro. *In*: AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 5. ed. Ouro Fino, MG: Ceres, 2016. v. 2, p.697-731.

ITAKO, Adriana Terumi et al. **Control of bacterial spot of tomato and activation of enzymes related to resistance by chemicals under field conditions.** *Journal of Agricultural Science*, p. 100-109, 2014.

JI, Dongjin et al. **Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, n. 2, p. 241-248, 2004.

- JONES, J. B. et al. **Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants.** *Phytopathology*, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.
- JONES, J. B.; STALL, R. E.; BOUZAR, H. **Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato.** *Annual review of phytopathology*, v. 36, n. 1, p. 41-58, 1998.
- JONES, Jeffrey B. et al. **Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper.** *Systematic and applied microbiology*, v. 27, n. 6, p. 755-762, 2004.
- KLEIN-GORDON, Jeannie M. et al. **Assessing changes and associations in the *Xanthomonas perforans* population across Florida commercial tomato fields via a statewide survey.** *Phytopathology*, v. 111, n. 6, p. 1029-1041, 2021.
- LANG, Gerhard et al. **Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*.** *Journal of natural products*, v. 71, n. 6, p. 1074-1077, 2008.
- LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; PINHO, RSC de. **Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*.** *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- LAPICCIRELLA, J. N., et al. **O Uso e Compartilhamento de Práticas Agroecológicas na Agricultura Familiar.** *Cadernos de Agroecologia*, v. 17, n. 2, 2022.
- LEÃO, Evelynne Urzêdo et al. **Potencial *in vitro* de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum.** *Summa Phytopathologica*, v. 42, p. 360-362, 2016.
- LI, J.; HU, K.; WEBSTER, J. M. **Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) (review).** *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, v. 34, p. 1331-1339, 1998.
- LI, Jianxiong; CHEN, Genhui; WEBSTER, John M. **Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae).** *Canadian journal of microbiology*, v. 43, n. 8, p. 770-773, 1997.
- LIANG, Sun et al. **Origin of the domesticated horticultural species and molecular bases of fruit shape and size changes during the domestication, taking tomato as an example.** *Horticultural Plant Journal*, v. 3, n. 3, p. 125-132, 2017.
- LIAO, Y.-Y. et al. **Nano-Magnesium oxide: A novel bactericide against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* causing tomato bacterial spot.** *Phytopathology*, v. 109, n. 1, p. 52-62, 2018.
- LOGAN, Niall A.; DE VOS, Paul. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174 AL. *In*: DE VOS, Paul et al., 2009

MARCUZZO, Leandro Luiz. **Epidemiologia e previsão da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro**. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2008.

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. **Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo**. Summa Phytopatologica, v. 23, n. 2, p. 160-162, 1997.

MARINGONI, Antonio Carlos. **Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium**. Fitopatologia Brasileira, v. 27, p. 157-162, 2002.

MATES, Aveline de Paula Kuyat. **Mecanismos de controle da mancha bacteriana do tomateiro exercidos por rizobactérias**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2017.

MCINERNEY, Bernie V. et al. **Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity**. Journal of Natural Products, v. 54, n. 3, p. 774-784, 1991a.

MCINERNEY, Bernie V. et al. **Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity**. Journal of Natural Products, v. 54, n. 3, p. 785-795, 1991b.

MCINNES, T. B. et al. **Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields**. Plant Disease, v. 72, n. 7, p. 575-579, 1988.

MELO, Paulo César T. de; VILELA, Nirlene J. **Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na década de 90**. Horticultura Brasileira, v. 22, p. 154-160, 2004.

MONTEIRO, F. P. et al. **Delving into Chemical Control Options for Bacterial Canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in Tomatoes: An In-vitro Study**. Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research, v. 11, n. 3, p. 17-26, 2024.

MONTEIRO, Leila; MARIANO, Rosa de Lima Ramos; SOUTO-MAIOR, Ana Maria. **Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 23-29, 2005.

MORAES, Elenice da Silva; MENELAU, Almir Silveira. **Análise do mercado de feijão comum**. Revista de Política Agrícola, v. 26, n. 1, p. 17-30, 2017.

MORINIÈRE, Lucas et al. **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, v. 43, n. 4, p. 126087, 2020.

MOTOYAMA, Márcia Mikie et al. **Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***. Acta Sci. Agron, v. 25, p. 509-512, 2003.

MUNENE, Lilian Wangui. **Bacterial biological control agents in the management of bacterial wilt (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) in the common bean.** 2023. Dissertação. UoEm.

MUSSON, G.; MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. **Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton.** *Biocontrol Science and Technology*, v. 5, n. 4, p. 407-416, 1995.

NASCIMENTO, Abadia dos Reis. **Ação de produtos químico in vitro, em mudas e em campo sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*) em tomate para processamento industrial.** 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

OHLENDORF, Birgit et al. **Szentiamide, an N-formylated cyclic depsipeptide from *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338T.** *Natural Product Communications*, v. 6, n. 9, p. 1934578X1100600909, 2011.

OLIVEIRA, Gilmar Martins de. **As relações entre os agentes da cadeia produtiva do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e a inserção comercial da tecnologia da resistência ao mosaico dourado.** 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2022.

ONGENA, Marc; JACQUES, Philippe. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

OSDAGHI, Ebrahim; YOUNG, Anthony J.; HARVESON, Robert M. Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. **Molecular plant pathology**, v. 21, n. 5, p. 605-621, 2020.

PARRA, José Roberto P. et al. Controle biológico: terminologia. *In: Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores.* São Paulo: Manole, p. 1-16, 2002.

PARRA, José Roberto Postali et al. (ED.). Conceitos e evolução do controle biológico. Em: **Controle Biológico com parasitóides e predadores na agricultura brasileira.** [s.l.] Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2023.

PEDROSO, M. T. M. **Estudo exploratório da cadeia produtiva do tomate para a indústria.** DF: Embrapa Hortaliças, 2020, 26p. (Documentos, 181).

PEI, D. et al. Endophytic *Bacillus subtilis* P10 from *Prunus cerasifera* as a biocontrol agent against tomato *Verticillium* wilt. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e244261, 2021.

PENHA, Rafaela O. et al. ***Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations.** *Planta*, v. 251, p. 1-15, 2020.

POTNIS, Neha et al. **Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge.** *Molecular plant pathology*, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015.

- QUEZADO - DUVAL, Alice Maria. **Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas a mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil**. 2003. (Tese de Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 2003.
- QUEZADO-DUVAL, A. M. et al. **Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil**. *In: I International Symposium on Tomato Diseases* 695. 2005.
- QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. **Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria**. DF: Embrapa Hortaliças, 2010, 24p. (Circular Técnica, 84).
- ROCHA, Lucas Antônio et al. **Potencial de isolados de *Bacillus* sp. para o controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. *Revista Ciência Agrícola*, v. 14, n. 1, p. 45-50, 2016.
- RODRIGUES, L.M.R.; ALMEIDA, I.M.G.; PATRICIO, F.R.A.; BERIAM, L.O.S.; MACIEL, K.W.; BRAGHJINI, M.T.; GUERREIRO FILHO, O. **Aggressiveness of strains and inoculation methods for resistance assessment to bacterial halo blight on coffee seedlings**. *Journal of Phytopathology*, v.165, p. 105-114, 2017
- SCHEPERS, H. T. A. M. et al. **Reduced efficacy of fluazinam against *Phytophthora infestans* in the Netherlands**. *European journal of plant pathology*, v. 151, p. 947-960, 2018.
- SCHUSTER, M. L.; VIDAVER, Anne K.; MANDEL, M. **A purple pigment producing bean wilt bacterium, *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum*, n. var.** *Canadian Journal of Microbiology*, v. 14, p. 423-427, 1968.
- SHANER, Gregory; FINNEY, Robert E. **The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat**. *Phytopathology*, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- SHIOMI, H. F.; FERREIRA, M. V. R.; MELO, I. S. **Bioprospecting bacterial strains for biological control of white mold on soybean**. *Scientific Electronic Archives*, v. 10, n. 2, p. 56-63, 2017.
- SILVA, JULIANA RESENDE CAMPOS et al. **Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro**. *Ciência e agrotecnologia*, v. 32, p. 1062-1072, 2008.
- SILVA, O. F.; WANDER, A. E. **O feijão-comum no Brasil passado, presente e futuro**. Documentos 287. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e feijão, 2013.
- SILVA, Ricardo Pereira. **Biocontrole da mancha bacteriana em tomate para processamento por *Bacillus velezensis* GF267**. Trabalho de Conclusão de Curso. 2019. (Bacharelado em Agronomia) - Instituto Federal Goiano, Morrinhos, 2019.
- SOARES, R. M. ***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* na cultura da soja**. Documentos, 389. Londrina: Embrapa Soja, 2017.

SOARES, R. M. et al. **First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil.** Tropical Plant Pathology, Brasília, v. 38, p. 452-454, 2013.

STALL, R. E. et al. **Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 44, n. 1, p. 47-53, 1994.

SUN, Lei et al. ***Bacillus velezensis* BVE7 as a promising agent for biocontrol of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum*.** Frontiers in Microbiology, v. 14, p. 1275986, 2023.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-Curtobacterium. In: PRIA, M. D.; SILVA, O. C. **Cultura do feijão: doenças e controle.** Paraná: UEPG, 2018, cap. 2, p. 23-30.

THEODORO, Gustavo de Faria; MARINGONI, Antonio Carlos. **Ação de produtos químicos *in vitro* e *in vivo* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro.** Scientia Agricola, v. 57, p. 439-443, 2000.

UTAMI, Desi; MEALE, Sarah Jade; YOUNG, Anthony Joseph. **A Pan-Global Study of Bacterial Leaf Spot of Chilli Caused by *Xanthomonas* spp.** Plants, v. 11, n. 17, p. 2291, 2022.

VALENTINI, G. et al. ***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle.** Revista Biotemas, Florianópolis, v. 23, p. 1-8, 2010.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of xanthomonas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

WANG, Xin et al. **Isolation of the novel strain *Bacillus amyloliquefaciens* F9 and identification of lipopeptide extract components responsible for activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Plants, v. 11, n. 3, p. 457, 2022.

WANG, Yonghong et al. **Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology.** Microbial Cell Factories, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2011.

WEBSTER, John M.; CHEN, Genhui; HU, Kaiji; LI, Jianxiong. Bacterial Metabolites. In: GAUGLER, Randy (ed.). **Entomopathogenic Nematology.** New York: Cabi International, 2002. p. 99-137.

WENDLAND A, Moreira AS, Bianchini A, Giampan JS and Lobo Junior M (2016) **Doenças do feijoeiro.** In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 5th edn, Ceres, São Paulo, p.383-396.

YOUNES, Nabil A.; DAWOOD, Mona FA; WARDANY, Ahmed A. **The phyto-impact of fluazinam fungicide on cellular structure, agro-physiological, and yield traits of pepper and eggplant crops.** Environmental Science and Pollution Research, v. 27, p. 18064-18078, 2020.

YOUNG, J. M. et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

YRUELA, Inmaculada. **Plant development regulation: Overview and perspectives**. *Journal of plant physiology*, v. 182, p. 62-78, 2015.