

***Bacillus amyloliquefaciens, Microbacterium Resistens e Stenotrophomonas Maltophilia no biocontrole de Corynespora Cassiicola na cultura do tomate***

***Bacillus amyloliquefaciens, Microbacterium Resistens and Stenotrophomonas Maltophilia in biocontrol of Corynespora Cassiicola in tomato culture***

DOI:10.34117/bjdv9n1-324

Recebimento dos originais: 23/12/2022

Aceitação para publicação: 23/01/2023

**Gersimar Pereira Monteiro**

Mestre em Agricultura no Trópico Úmido

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Endereço: Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, CEP: 69067-375, Manaus - AM

E-mail: gmonteiro@ieee.org

**Aldenora dos Santos Vasconcelos**

Mestranda em Biotecnologia

Instituição: Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade de Estado do Amazonas (UEA)

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, CEP: 69065-001, Manaus - AM

E-mail: aldenora.svasconcelos@gmail.com

**Rogério Eiji Hanada**

Doutor em Biotecnologia

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Endereço: Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, CEP: 69067-375, Manaus – AM

E-mail: rhanada.inpa@gmail.com

**Ariel Dotto Blind**

Doutor em Agronomia Tropical

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Endereço: Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, CEP: 69067-375, Manaus – AM

E-mail: ariel.blind@inpa.gov.br

**Tagleorge Marques Silveira**

Doutorando em Engenharia Eletrotécnica

Instituição: Instituto Superior de Tecnologias Avançadas (ISTEC) - Porto, Universidade de Aveiro (UA)

Endereço: Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Aveiro, Portugal

E-mail: tagleorge@ieee.org

**RESUMO**

Este artigo apresenta uma abordagem sobre o uso de controle biológico aplicando a ação de bactérias contra *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei pois este é um dos principais fitopatógenos de propagação aérea que limita a produtividade das solanáceas.

A utilização de bactérias no controle de doenças em solanáceas é uma metodologia em difusão, pois o biocontrole de fitopatógenos realizado por bactérias pode ocorrer por diferentes mecanismos como a inibição por antibióticos, o parasitismo, a competição pelo espaço físico ou a indução de resistência da planta ao ataque de patógenos. Esta pesquisa visou selecionar, identificar e avaliar *in vitro* e *in planta* bactérias antagonistas com potencial para desenvolvimento de um bioproduto que contribua para o desenvolvimento agrícola sustentável de tomate. As coletas e os testes *in planta* foram realizadas na Estação Experimental de Hortaliças Dr. Alejo von Der Pahlen, KM 14 da estrada AM 010 (S: 02° 59' 45,7" e W: 60° 01' 22,3"). Os testes *in vitro* foram realizados na Embrapa Amazônia Ocidental. Os resultados indicam que o *Bacillus amyloliquefaciens*, apresentou 75,73% de inibição do *C. cassiicola* *in vitro* e 56% de controle da mancha-alvo quando comparado ao *Microbacterium resistens* e a *Stenotrophomonas maltophilia* nos testes em tomateiro.

**Palavras-chave:** solanáceas, bactérias, biocontrole, bioproduto.

### ABSTRACT

This article presents an approach on the use of biological control applying the action of bacteria against *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei, as this is one of the main phytopathogen of aerial propagation that limits the productivity of solanaceous plants. The use of bacteria in the control of solanaceous diseases is a widespread methodology, since the biocontrol of phytopathogen carried out by bacteria can occur through different mechanisms such as inhibition by antibiotics, parasitism, competition for physical space or induction of plant resistance to pathogen attack. This research aimed to select, identify and evaluate *in vitro* and *in plant* antagonist bacteria with potential for the development of a bioproduct that contributes to the sustainable agricultural development of tomatoes. In plant collections and tests were carried out at the Dr. Alejo von Der Pahlen, KM 14 on road AM 010 (S: 02° 59' 45.7" and W: 60° 01' 22.3"). The *in vitro* tests were carried out at Embrapa Amazonia Ocidental. The results indicate that *Bacillus amyloliquefaciens* showed 75.73% of *in vitro* inhibition of *C. cassiicola* and 56% of target spot control when compared to *Microbacterium resistens* and *Stenotrophomonas maltophilia* in tests on tomato.

**Keywords:** solanaceae, bacteria, biocontrol, bioproduct.

## 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.), pertence à família das solanáceas e é originário da região andina, compreendendo Peru, Bolívia e Equador, no entanto, é apreciado em todos os continentes (CAMARGO et al., 2006). Possui características nutricionais interessantes, como baixo valor calórico e fonte de antioxidantes como licopeno e rico em vitaminas A, B e C e dos sais minerais potássio, ferro e fósforo (Duma et al., 2015). Bem como se destaca como sendo um fruta caracterizada como hortaliça mais consumida em todo o globo. (Dahlke et al., 2019; FAO, 2019). O cultivo do tomateiro pode ser comprometido por diversas doenças de origem fúngica que podem

causar prejuízos econômicos significativos na safra (LOPES e ROSSATO, 2013; RODRIGUES et al., 2018).

A mancha alvo causada por *Corynespora cassiicola* (Bert & Curt) Wei é uma das principais doenças fúngicas de dispersão aérea que infecta cultivos de solanáceas. Por esta motivo, pesquisas envolvendo a utilização de microrganismos antagonistas tem se intensificado pois de forma prospectiva indica ter potencial quanto a sua utilização para o controle de fito doenças de importância econômica (LOPES et al., 2015).

O controle biológico de fitopatógenos realizado por bactérias pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como por antibiose, parasitismo, competição pelo espaço físico ou a indução de resistência da planta devido ao ataque de patógenos (OLIVEIRA et al., 2010; TOYOTA et al., 2015). De acordo com Oliveira et al. (2014) um dos principais grupos utilizados no biocontrole são as actinobactérias. Vergnes et al. (2020) constataram que actinobactérias podem se desenvolver na superfície das folhas de plantas e expor seu potencial quanto ao gerenciamento de doenças como, por exemplo, induzindo respostas de defesa e proteção contra patógenos fúngicos foliares.

Yamunarani e Pandiyan (2019) enfatizam a importância do monitoramento e da execução de novas pesquisas utilizando actinobactérias com potencial para o desenvolvimento de novos biofertilizantes e uso como biocontrole.

O monitoramento da ação de agentes biológicos no controle de doenças fitopatogênicas é em sua maioria realizado por trabalho humano direto e integral no local de cultivo. Porém, a automação do monitoramento da ação de biocontrole em cultivos agrícolas pode facilmente ser realizado por sensor óptico em tempo real, pois nos estudos de Askra et al. (2016) constataram que sensores de diferenciação de plantas baseado nas imagens captadas com a refletância espectral proximal das folhas permite diferenciar a planta cultivada da erva daninha com uma precisão de 90%.

O monitoramento automatizado da ação danosa por microrganismos fitopatogênicos também já é uma realidade no processo da agricultura inteligente, pois nos estudos de Udutalapally et al. (2021) verificou-se que o Sistema Ciber-Físico Agrícola (A-CPS) usando a rede mundial de comunicação web através da Internet-of-Agro-Things (IoAT) realizando o comparativo entre imagens de folhas saudáveis com folhas sob ataque fitopatogênico chegaram aos resultados de que esta tecnologia inovadora de cultivos não apenas melhora a qualidade e a produtividade das culturas agrícolas como por

sensoriamento contínuo e automação inteligente alcança uma precisão de 99,24% quanto a previsão ou maximização de controle de doenças foliares em tomateiro.

Diante desse contexto, esta pesquisa visou identificar bactérias antagonistas que realizam a inibição de fitopatógenos, propiciando efeito protetivo do tomateiro (*S. lycopersium*), sirva de fundamentação para o desenvolvimento de bioinsumos que contribuam para o desenvolvimento agrícola sustentável de solanáceas e que futuramente a ação de inibição bacteriana contra as fitodoenças foliares sejam realizadas pelo uso de um sensor de imagem óptica captada em tempo real por meio de dispositivos inteligentes que usem 5G/6G e IoT.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO

O fitopatógeno *C. cassiicola* foi isolado de folhas de tomateiro apresentando sintomas característicos de mancha alva. As coletas foram realizadas na área de cultivo de tomate, na Estação Experimental de Hortaliças Dr. Alejo von Der Pahlen, KM 14 da estrada AM 010 (S: 02° 59' 45,7" e W: 60° 01' 22,3"). Os conídios dos fungos associados às lesões foram transferidos para placa de Petri contendo meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) (200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g ágar e 1 L de água). As placas foram mantidas em BOD a 25 °C, por cinco a sete dias. As hifas desenvolvidas foram repicadas para placas contendo BDA e mantidas em BOD a 25 °C por dez dias e armazenadas em refrigerador a 5 °C. Os isolados selecionados para os testes nesta pesquisa foram confirmados por técnicas de biologia molecular conforme descrito no item 2.4.

### 2.2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS CONTRA PATÓGENOS DE TOMATEIRO

As bactérias antagonistas foram selecionadas com base no método de cultura pareada quanto à atividade antagonista contra o fitopatógeno de tomateiro *C. cassiicola* (INPA 2671). Foram avaliadas 60 bactérias da coleção de microrganismos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental (SISGEN nº AB6B14F), isoladas de raízes de *Paullinia cupana* e sedimentos do rio Solimões. Esses isolados foram reativados em meio de cultura BDA e mantidos em câmara de crescimento BOD a 28 ± 2 °C sob regime de 12 h de luz. As triagens foram realizadas individualmente em placas de Petri de 90 x 15 mm com meio BDA na atividade antagônica contra *C. cassiicola*. As avaliações foram realizadas pela análise de cultura pareada de acordo com Bastos (1997),

a fim de identificar os três melhores antagonistas para seguirem para a próxima etapa de avaliação. Cada experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com apenas uma unidade amostral por tratamento. Dos 60 isolados bacterianos foram selecionadas os três: PcA1, Sol 194 e Sol 195 que mostraram potencial para inibir o crescimento de *C. cassicola* invitro.

### 2.3 ANÁLISE DA INIBIÇÃO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS CONTRA PATÓGENOS DE TOMATEIRO

A análise de antagonismo ocorreu de forma que um disco de 3 mm de diâmetro do do fungo foi retirado após 72 h de cultivo e transferido ao centro da placa de Petri contendo meio BDA e a aproximadamente 2 cm de distância foram feitos dois arrastes com as bactérias com aproximadamente 2 mm de largura por 3 cm de comprimento (um de cada lado). O controle consistiu do cultivo do fitopatógeno na ausência do antagonista. As placas foram mantidas em câmara de crescimento BOD a  $28 \pm 2$  °C sob regime de 12 h de luz. As avaliações foram realizadas a cada sete dias até o vigésimo primeiro dia (PI<sub>7d</sub>, PI<sub>14d</sub>, PI<sub>21d</sub>). A partir das medições foi calculado o percentual de inibição de crescimento micelial dos fungos patogênicos de acordo com a fórmula (LEE et al., 2014):

$$Inhibition (\%) = \left[ \frac{(R - r)}{R} * 100 \right]$$

Onde:

R = crescimento radial do patógeno na placa controle;  
r = crescimento radial do patógeno em culturas pareadas.

### 2.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ANTAGONISTAS E PATÓGENOS

As três bactérias antagonistas selecionadas PcA1, SOL 194 e SOL 195 foram cultivadas em meio líquido de ISP2 (3 g de extrato de malte, 3 g de extrato de levedura, 10 g de dextrose, 1 L de água destilada, pH 6,2) por 48 horas a 37 °C. Em seguida centrifugadas para obtenção da massa bacteriana. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit de purificação Wizard Genomic DNA Purification (Promega). O protocolo de extração foi o CTAB de Doyle (1991) em micro extração com sílica para as bactérias e em macro extração com nitrogênio líquido para o fungo.

A identificação molecular das bactérias foi conduzida pela amplificação de fragmentos do RNA ribossomal 16S (16S rRNA), utilizando o primer P027F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (WHITE et al., 1990; KUMARAE E SOUSA, 2002)..

O isolado fúngico INPA 2671 foi identificado com os primers ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e NL4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White et al., 1990; Kumarae e Sousa, 2002). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µl, contendo: 50 ng de DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X buffer de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase. O termociclador programado para desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento 55 °C por 60 seg, alongação a 72 °C por 1,5 min. Elongação final a 72 °C por 5 min. Os fragmentos submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) com marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen), revelados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV light usando o Molecular Imaging System (Loccus Biotecnologic L-Pix. Chemi). Os produtos de PCR também foram purificados com PEG 20% e incubados em termociclador por 15 minutos a 37 °C (Applied Biosystems) para serem usados nas reações de sequenciamento realizadas com o volume de 10 µl (5 µl produto de PCR purificado, 2 µl de Bigdye v 3.1 (Thermo Fisher), 2 µl do buffer 5 X (Applied Biosystems) e 3,2 pmol de cada primer. O termociclador programado para 96 °C por 4 min, seguido por 30 ciclos a 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. As reações de sequenciamento foram analisadas no sequenciador Genetic Biosystems 3500 (Applied Biosystems/Hitachi).

A identificação das bactérias e do fungo foi conduzida pela análise filogenética com base nas sequências obtidas juntamente com sequências do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih>). As sequências individuais foram alinhadas com o software Clustal W (ZHU et al., 2015) para a observação da árvore filogenética no programa MEGA v.11 (DONTHU et al. 2021). A topologia da árvore avaliada por meio da análise de bootstrap usando 1000 reamostragens.

## 2.5 AVALIAÇÃO DAS BACTÉRIAS EM EXPERIMENTOS *IN PLANTA*

A avaliação do controle de *C. cassicola* no tomateiro utilizando as bactérias selecionadas foram conduzidos em casa-de-vegetação na Estação Experimental de

Hortaliças, Dr Alejo Von Der Pahlen do INPA, (Rodovia AM 010, km 14, Manaus-AM). No geral as avaliações foram realizadas a cada 5 dias por um período de 35 dias após a inoculação das bactérias nas mudas, totalizando 6 avaliações. O parâmetro avaliado *in planta* foi a severidade da doença.

A possibilidade de controle da doença foi estudada em três experimentos independentes. No experimento para analisar o efeito preventivo as bactérias putativas biocontroladoras foram inoculadas 5 dias antes da inoculação do fitopatógeno. No experimento do efeito coinoculado as bactérias putativas biocontroladoras foram inoculadas concomitantemente com o fitopatógeno. No experimento do efeito curativo as bactérias putativas biocontroladoras foram inoculadas quando a doença estava iniciando os sintomas na planta. O controle positivo foi inoculado somente o patógeno sem a bactéria putativa biocontroladora e o controle negativo somente água estéril. Os extratos bacterianos foram obtidos por meio do crescimento em meio de cultura ISP2 líquido, sob agitação mecânica de 200 rpm por até 24 horas, tendo a densidade ótica ajustada para  $A_{540} = 0,5$  (concentração aproximada de  $10^8$  ufc  $mL^{-1}$ ). Em seguida, centrifugado a 7800 rpm por 6 minutos a 15 °C em centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5430 R) e a massa bacteriana diluída em água estéril. (ROCHA e MOURA, 2013). Utilizado o substrato comercial Tropstrato HT Hortaliça autoclavado a 120 °C a 1 atm (Makishima e Carrijo, 1998).

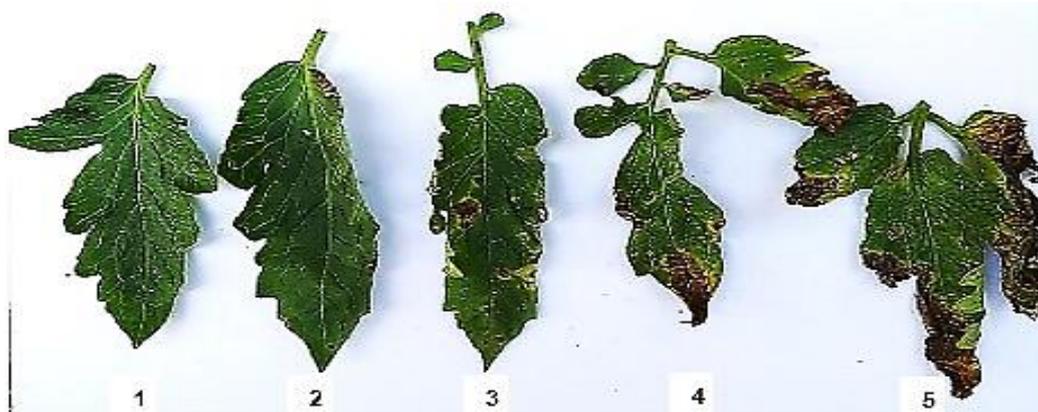
Utilizada a cultivar de tomate Santa Cruz semeada diretamente em copos plásticos de 500 mL contendo o substrato. Uma fertirrigação com 50 mL de N-P-K (Plantafol 20:20:20) na concentração de 2 g  $L^{-1}$  foi realizada 72 horas antes da semeadura.

Realizadas duas irrigações mecanizadas e automatizadas em aspersão por dia por um período de 15 minutos cada. A partir do trigésimo dia após a semeadura também foram realizadas duas irrigações manuais com 50 mL de água direto na unidade experimental. A cada sete dias as unidades experimentais foram fertirrigadas (CARRIJO et al., 2005) com 50 mL de Plantafol 20:20:20 diluído em água natural e obedecendo à quantidade de 2 g  $L^{-1}$ .

A quantificação da severidade da mancha-alvo causada pelo fungo *C. cassiicola* foi feita a cada cinco dias, com base na escala diagramática de notas para análise da severidade da mancha-alvo proposta por Costa (2012) que estabelece as seguintes notas: 1 = folíolo sadio; 2 = severidade baixa, até 10% do tecido lesionado; 3 = severidade

média, 11 a 20% do tecido lesionado; 4 = severidade média-alta, 21 a 40% do tecido lesionado; 5 = severidade alta, acima de 40% com grandes áreas necrosadas (Figura 1).

Figura 1 – Escala diagramática de notas para análise da severidade de *Corynespora cassiicola* em folíolos de tomateiro.



Fonte: Costa (2012) com adaptações do autor desta pesquisa, 2022.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos casualizado (DBC) com cinco repetições por tratamento. Para verificar a diferença nos tratamentos de todos os experimentos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e subsequentemente realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ). As análises foram conduzidas utilizando o software SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2019).

Os experimentos foram composto por cinco tratamentos, sendo: tratamento 1: controle positivo (com *C. cassiicola* e sem bactérias antagonistas); tratamento 2: isolado PcA1 e *C. cassiicola*; tratamento 3: isolado Sol 194 e *C. cassiicola*; tratamento 4: isolado Sol 195 e *C. cassiicola* e tratamento 5: controle negativo (sem ambos *C. cassiicola* e bactérias antagonistas) somente água estéril.

As inoculações de *C. cassiicola* nos tomateiros foram realizadas quando as plantas apresentavam quatro folhas verdadeiras. O fungo foi inoculado por aspersão de 10 mL da solução contendo uma suspensão calibrada em  $10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  (câmara de Neubauer) na região foliar de cada unidade experimental delineada para o recebimento do fitopatógeno (TERAMOTO et al. 2013). Sendo que em cada unidade experimental cinco folíolos de cada uma das três últimas folhas compostas da região apical receberam cinco picadas com uma agulha estéril para facilitar a entrada do patógeno no tecido vegetal. Esta mesma técnica foi utilizada para a inoculação dos agentes biocontroladores.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO IN VITRO DAS BACTÉRIAS CONTRA *C. CASSIICOLA* DE TOMATEIRO

A triagem realizada com 60 bactérias indicou que os três isolados: PcA1, Sol 194 e Sol 195, mostraram potencial para inibir o crescimento do fitopatógeno *C. cassiicola* (isolado INPA 2671). As antagonistas selecionadas e o fungo foram submetidos à identificação molecular e os resultados são apresentados na tabela 2.

As avaliações *in vitro* realizadas contra *C. cassiicola* apresentaram eficiência de inibição de 75,73%.

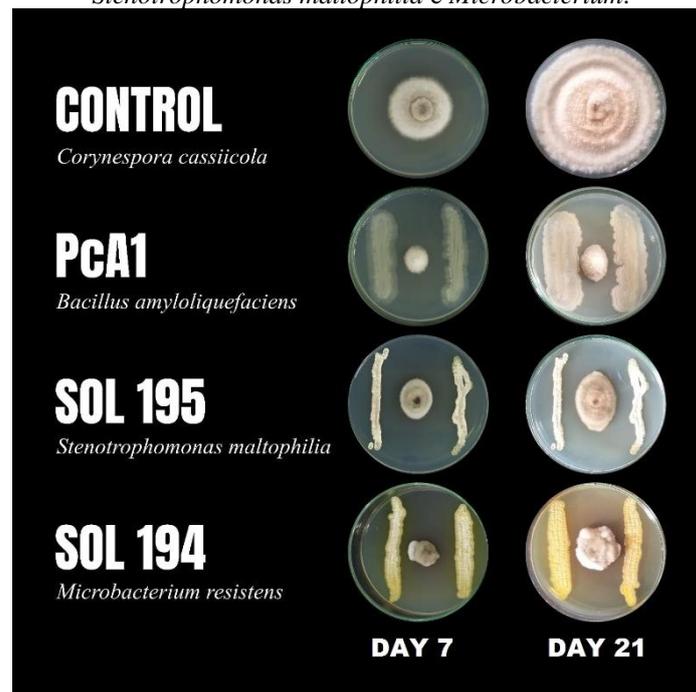
O isolado Sol 194 apresentou 66,54% de inibição contra *C. cassiicola* após 7 dias. Seguido do Pc A1 com média do percentual de 60,74% e do Sol 195 com 58,69% de inibição. Nas análises do percentual de antagonismo de 14 dias o Pc A1 apresentou o maior percentual de inibição com 70,20%, seguido do isolado Sol 194 com 65% de inibição. Com 21 dias também foi o Pc A1 que permaneceu de forma progressiva com a maior a maior porcentagem de inibição 75,73% (Tabela1) (Figura 2).

Tabela 1 – Médias de porcentagens de inibição *Corynespora cassiicola* entre 7 e 21 dias de avaliação.

<b>Isolado bacteriano</b>	<b>%-Inibição 7 dias</b>	<b>%-Inibição 14 dias</b>	<b>%-Inibição 21 dias</b>
<b>Sol 195</b>	58,69 b	63,35 b	61,47 b
<b>Pc A1</b>	60,74 b	70,20 b	75,73 b
<b>Sol 194</b>	66,54 b	65,00 b	59,25 b
<b>CV (%)</b>	9,91	10,46	16,25
<b>DMS</b>	15,38	17,33	20,88

Medidas de tratamentos seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ). CV: Coeficiente de variação. DSM: Desvio médio de significância.

Figura 2 – Avaliação em cultura pareada por 21 dias de *C. cassiicola* contra *Bacillus amyloliquefaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Microbacterium*.



Fonte: Monteiro, 2022.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ANTAGONISTAS E PATÓGENOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

A análise molecular com base no genoma completo do isolado PcA1 e da região 16 das demais bactérias, revelou que PcA1 pertence a espécies *Bacillus amyloliquefaciens* com base no dDDH acima de 70%, o isolado Sol 194 apresentou 87,99% de identidade com *Microbacterium resistens* e o isolado Sol 195 com 96,44% como *Stenotrophomonas maltophilia* (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação molecular dos isolados utilizados neste estudo.

Isolado	Barcode	Id(%)	N de acesso	Identificação
PcA1	16S rDNA	96,54	OM541330.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain GRSB-21
SOL 194	16S rDNA	87,99	KF703723.1	<i>Microbacterium resistens</i> strain EAAG97
SOL 195	16S rDNA	96,44	KX350046.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain F3-2-41
<i>C. cassiicola</i> (INPA 2671)	ITS	99,58	MT470606.1	<i>Corynespora cassiicola</i> strain HEV244L

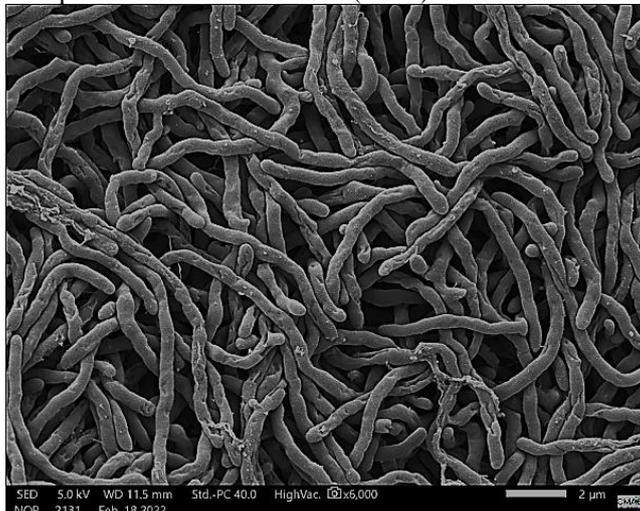
Fonte: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih>)

#### 3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A disposição das bactérias no momento da reprodução celular, com comportamento de desenvolvimento reprodutivo micelial (Figuras 3 e 4) e a estrutura de sua colônia parecida com fungos filamentosos (Figura 5) (Oliveira et al. 2014) indicam

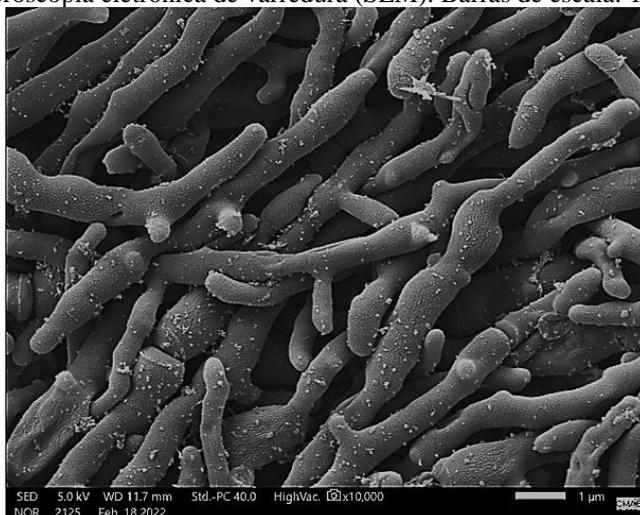
que dois dos isolados bacterianos, *Microbacterium resistens* (Sol 194) e *Stenotrophomonas maltophilia* (Sol 195) tratam-se de actinobactérias.

Figura 3 – Estrutura da colônia de *M. resistens* (SOL 194) semelhante a fungos filamentosos em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Barras de escala: 2 µm.



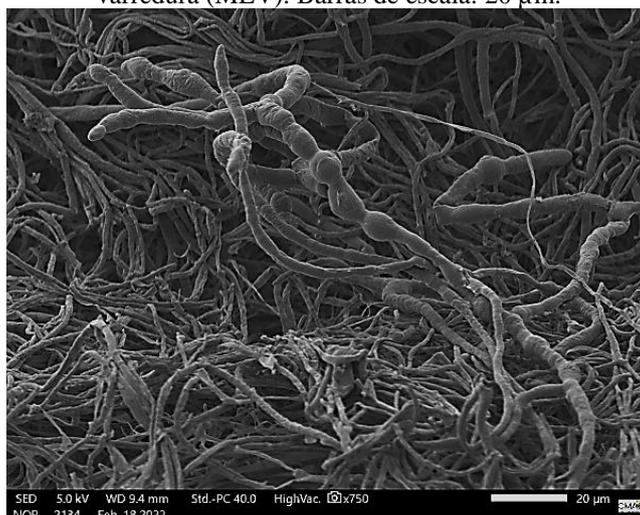
Fonte: Autor (2022).

Figura 4 – Estrutura da colônia de *S. maltophilia* (SOL 195) semelhante a fungos filamentosos em microscopia eletrônica de varredura (SEM). Barras de escala: 1 µm.



Fonte: Autor (2022).

Figura 5 – *Corynespora cassiicola* (INPA 2671) fungo filamentososo em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Barras de escala: 20 µm.



Fonte: Autor (2022).

### 3.3 AVALIAÇÃO *IN PLANTA* DAS BACTÉRIAS CONTRA *C. CASSIICOLA* DE TOMATEIRO

*In planta* no efeito preventivo, tanto a *Stenotrophomonas maltophilia* (Sol 195) quanto o *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1), mantiveram as menores médias de severidade da doença mancha-alvo com nota 2,6, não havendo diferenças estatística entre elas. Seguido da *Microbacterium resistens* (Sol 194) com a maior média (3,40), apresentando a menor eficiência no controle da doença mancha-alvo (Tabela 3) (Figura 5).

Quando avaliadas por meio de co-inoculação a *Microbacterium resistens* (Sol 194) apresentou a menor média (2,6), porém, sem diferença estatística quando comparada com as demais. Na avaliação do efeito curativo o *Bacillus amyloliquefaciens* (PcA1) manteve a menor média de severidade da doença mancha-alvo (2,8) permanecendo sem distinção estatística a nível de 5%. Já a *Stenotrophomonas maltophilia* (Sol 195) ficou com 3.4 de média de severidade da doença mancha-alvo. Seguida da bactéria Sol 194 com nota 4 de média de severidade da doença mancha-alvo (Tabela 3) (Figura 5).

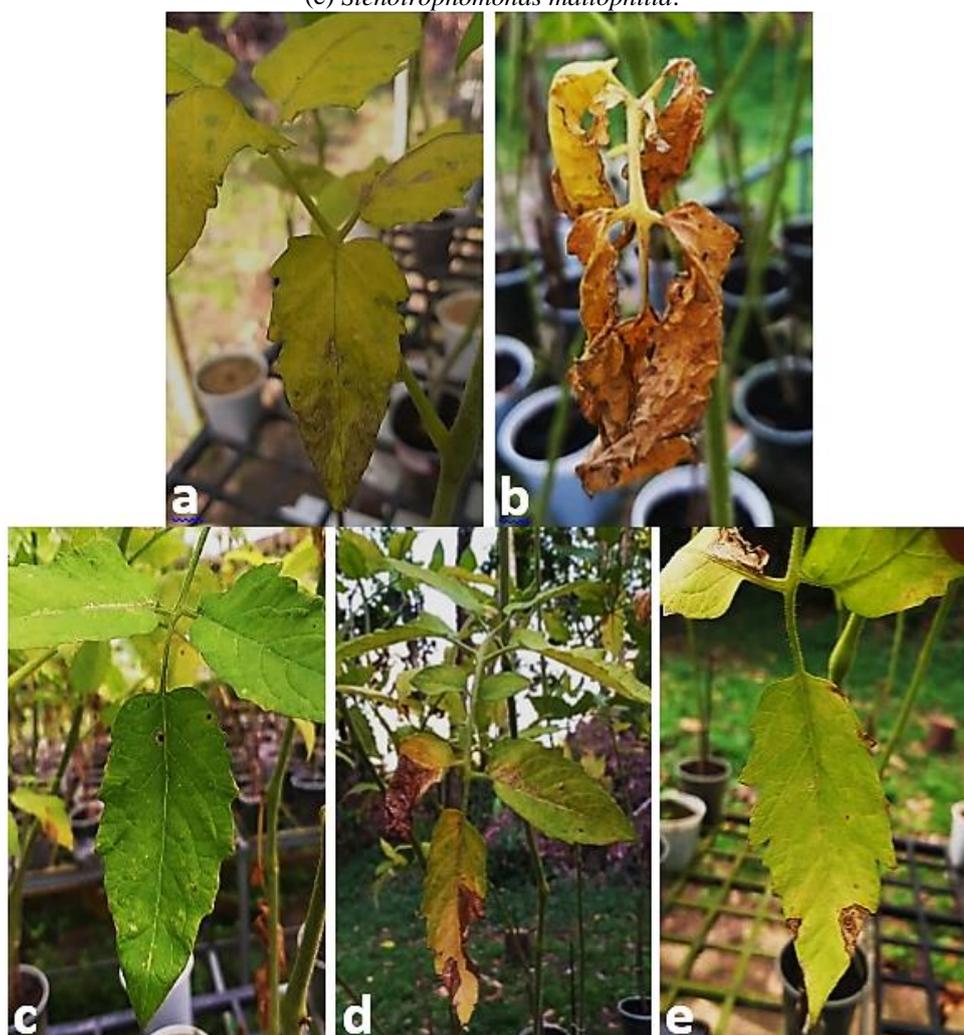
O isolado PcA1 manteve-se nos três testes a menor média de severidade desta doença no tomateiro. Tanto no efeito co-inoculado, quanto no efeito curativo, não apresentou alteração no valor da nota em relação ao controle da ação fitopatogênica do fungo *C. cassiicola* ao tomateiro, sendo considerado o mais eficiente no controle do fungo *C. cassiicola* no tomateiro em casa de vegetação (Tabela 3) (Figura 5).

Tabela 3 – Médias de severidades de *C. cassiicola* avaliadas no tomateiro.

Tratamento	Médias de Severidade		
	Efeito preventivo	Coinoculação	Efeito curativo
Sol 195	2,60 a	3,00 a	3,40 a b
Pc A1	2,60 a	2,80 a	2,80 a
Sol 194	3,40 a b	2,60 a	4,00 b c
Controle negativo	3,80 a b	4,80 b	4,80 c
Controle positivo	4,80 a b	5,00 b	4,60 c
CV (%)	29,93	16,02	16,13
DMS	1,94	1,10	1,19

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

Figura 6 – Avaliação da severidade da mancha-alvo por *C. cassiicola* em efeito preventivo por 35 dias: (a) Controle negativo. (b) Controle positivo. (c) *Bacillus amyloliquefaciens*. (d) *Microbacterium resistens* e (e) *Stenotrophomonas maltophilia*.



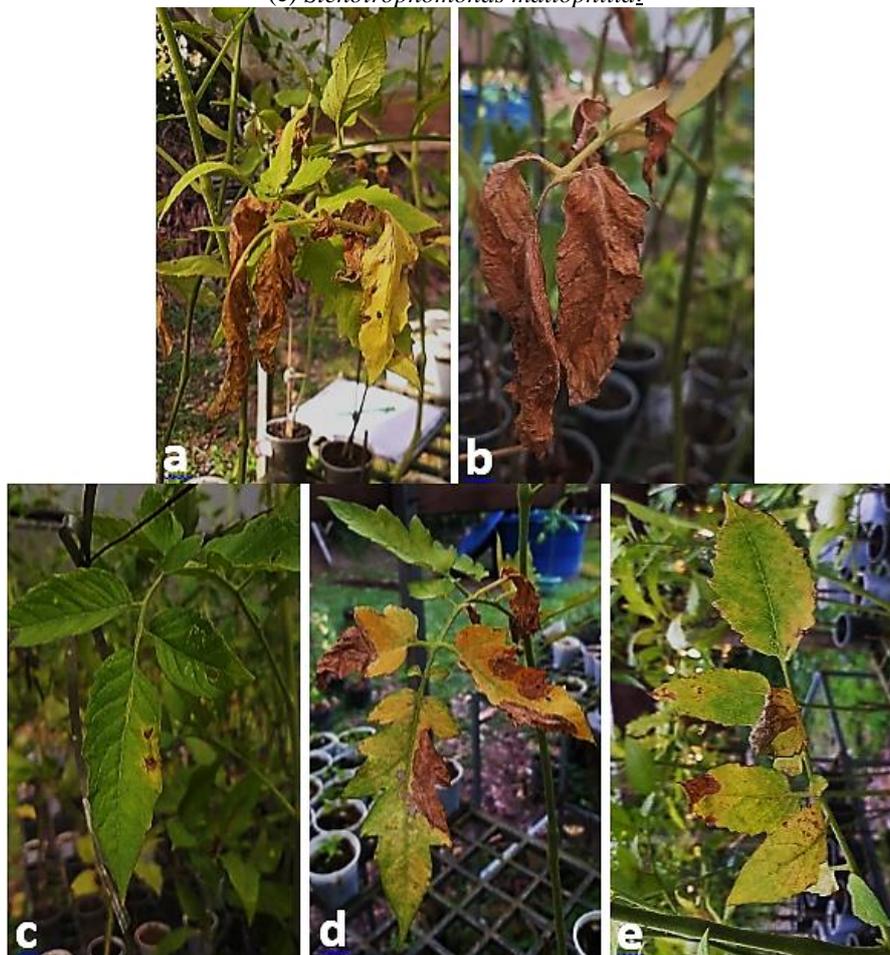
Fonte: Autor (2022).

Figura 7 – Avaliação da severidade da mancha-alvo por *C. cassicola* em efeito co-inoculado por 35 dias: (a) Controle negativo. (b) Controle positivo. (c) *Bacillus amyloliquefaciens*. (d) *Microbacterium resistens* e (e) *Stenotrophomonas maltophilia*.



Fonte: Autor (2022).

Figura 8 – Avaliação da severidade da mancha-alvo por *C. cassiicola* em efeito curativo por 35 dias: (a) Controle negativo. (b) Controle positivo. (c) *Bacillus amyloliquefaciens*. (d) *Microbacterium resistens* e (e) *Stenotrophomonas maltophilia*.



Fonte: Autor (2022).

#### 4 DISCUSSÕES

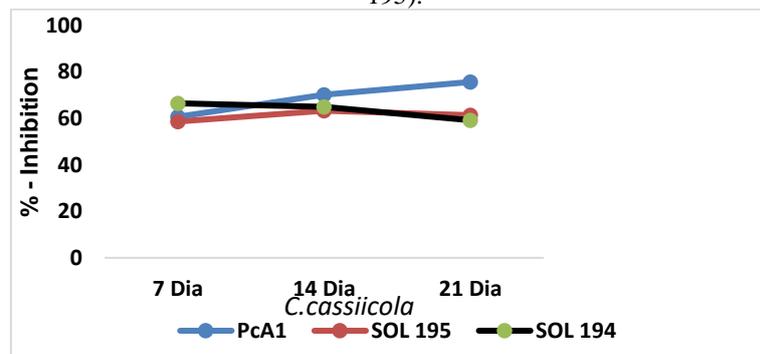
Os testes no período de sete dias de antagonismo *in vitro* (Gráfico 1) contra o fungo *C. cassiicola* indicaram que a *Microbacterium resistens* e a *Stenotrophomonas maltophilia* mesmo sem distinções estatísticas mas com diferenças numéricas em relação as bactérias avaliadas obtiveram percentual de inibição de *C. cassiicola* de 66,54% e 58,69% respectivamente. Este resultado contribui com os trabalhos de López *et al.* (2021), visto que em seus estudos *in vitro* dois isolados do gênero *Microbacterium* e dois isolados do gênero *Stenotrophomonas* reduziram em mais de 25% o crescimento de *C. cassiicola*.

O *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou 60,74% de inibição do crescimento de *C. cassiicola* nos testes de sete dias *in vitro*. E continuou de forma progressiva assumindo o primeiro lugar quanto ao percentual de inibição deste fungo nas demais avaliações até aos 21 dias (70,20% e 75,73% respectivamente). Os resultados do percentual de inibição

de *C. cassiicola* promovido pelo *Bacillus amyloliquefaciens* nesta presente pesquisa foram superiores aos resultados alcançados com os trabalhos de Riddech *et al.* (2017) pois em seus estudos pelo método de cultura dupla realizado por sete dias o *B. amyloliquefaciens* apresentou somente 47, 63% de inibição do fungo *C. cassiicola*.

Os resultados de controle do fungo *C. cassiicola* isolado de tomateiro pelo uso de *Bacillus* apresentando altos percentuais pode ser um indicativo promissor para ser usado na diminuição da incidência de doenças agrícolas de áreas tropicais (DOS SANTOS *et al.*, 2022). Assim como colaboram com os estudos de... no tocante ao uso do gênero bacillus como antagonista de crescimento de fungos fitopatênicos (GABARDO *et al.*, 2020)

Gráfico 1 – Análise da inibição em cultura pareada de 7 a 21 dias de *C. cassiicola* contra: *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1); *Microbacterium resistens* (Sol 194) e *Stenotrophomonas maltophilia* (Sol 195).



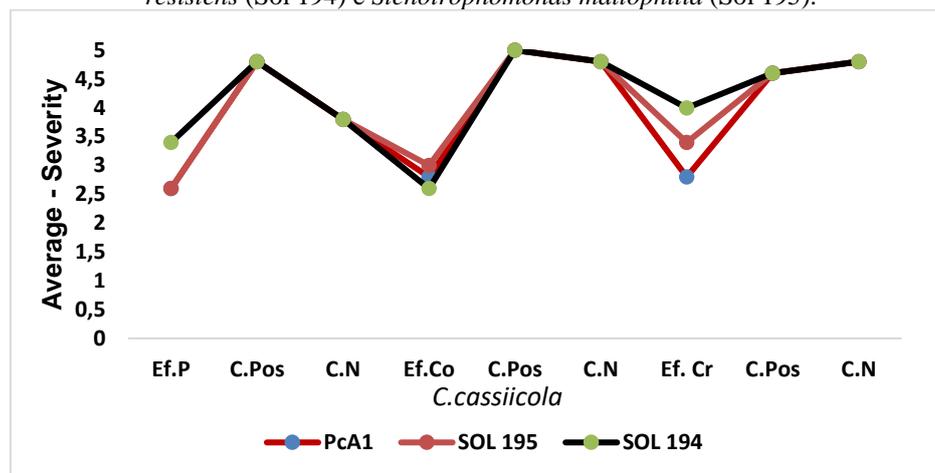
Fonte: Autor (2022).

Os testes *in planta* (Figura 6) indicaram situações importantes, como por exemplo, todas as unidades experimentais e principalmente o controle negativo onde as plantas que não foram inoculadas com o patógeno no decorrer dos experimentos foram infectadas com *C. cassiicola* e apresentam os sintomas da doença mancha-alvo com severidade maior que as tratadas com as putativas bactérias biocontroladoras. Estes resultados confirmam a veracidade dos estudos de Pernezny e Simone (1999) e das pesquisas de MacKenzie *et al.* (2018) os quais afirmam que a inoculação primária de *C. cassiicola* ocorre por conídios do fungo disseminados pelo ar. Outro resultado interessante foi que o *B. amyloliquefaciens* manteve a menor média de severidade da mancha-alvo quando comparados as demais bactérias avaliadas nos três experimentos e reduziu em 56% a severidade da doença mancha-alvo no tomateiro.

Os resultados avaliados *in planta* na ação antagônica contra *C. cassiicola* além de ser superiores aos avaliados por Imran *et al.* (2022), contribuem com a pesquisa destes

autores pois como a forma de infecção e a manifestação da doença do fungo *Alternaria solani* são semelhantes ao fungo *Corynespora cassiicola*, nos estudos destes autores o *B. amyloliquefaciens* reduziu em 36,58% a severidade da doença causada por *Alternaria solani* e neste estudo fica enfatizado que a eficiência de controle da mancha-alvo realizado pelo *B. amyloliquefaciens* foi de 56% .

Figura 10 – Análise de severidade da mancha-alvo *in planta* causada por *C. cassiicola* por 35 dias em casa de vegetação contra os isolados bacterianos: *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1); *Microbacterium resistens* (Sol 194) e *Stenotrophomonas maltophilia* (Sol 195).



Fonte: Autor (2022).

## 5 CONCLUSÕES

- 1- *In vitro* o *Bacillus amyloliquefaciens* manteve aumento progressivo de inibição do crescimento de *C. cassiicola* até o último dia de análise, com 75,73% de inibição. Mostrando ser o mais eficiente nos testes antagônicos contra *C. cassiicola*.
- 2- A *Stenotrophomonas maltophilia* e o *Bacillus amyloliquefaciens* foram os mais eficientes na redução da severidade da mancha alvo em tomateiro, quando utilizados de forma preventiva. O isolado SOL 194 apresentou maior eficiência no controle da mancha-alvo, quando avaliado na coinoculação. E o isolado PcA1 também foi o mais eficiente na redução da severidade da doença quando inoculado depois da doença estabelecida na planta (efeito curativo).
- 3- Como se avalia a severidade da mancha-alvo pelo desenvolvimento do alo necrótico no folíolo da planta e para isso é importante o uso de imagens, assim sendo, há uma necessidade real de se implantar um sistema de monitoramento digital com imagem em tempo real e que este sistema seja interligado a rede mundial de comunicação para que assim não apenas o produtor consiga gerenciar

com maior conhecimento dos agentes interferentes ao seu cultivo como possa ter maior precisão para tomadas de decisões quanto ao uso adequado de biocontroles.

Portanto, os resultados alcançados indicam que o *Bacillus amyloliquefaciens* (Pc A1) é eficiente contra *C. cassicola* e tem potencial de biocontrole da mancha-alvo. No entanto novas pesquisas precisam ser realizadas em um período maior que o destes estudos. Contudo, há perspectivas de se elucidar a formulação de um bioproduto a partir de metabólitos oriundo deste *Bacillus*, bem como a probabilidade de desenvolvimento de um produto biológico que atenda satisfatoriamente o controle da mancha-alvo para que assim agricultores de solanáceas possam ter sucesso em suas produções sem a necessidade da utilização de defensivos agrícolas.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPPEAM, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, à Embrapa Amazônia Ocidental e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Todos pelo incondicional apoio e empenho para a realização desta pesquisa científica.

## REFERÊNCIAS

ASKRABA, S.; PAAP, A.; ALAMEH, K.; ROWE, J.; MILLER, C. “Laserstabilized real-time plant discrimination sensor for precision agriculture,” *IEEE Sensors Journal*, vol. 16, no. 17, p. 6680–6686, 2016.

BASTOS, C. “Efeito do óleo de piper aduncum sobre crinipellis pernicioso e outros fungos fitopatogênicos,” *Fitopatologia Brasileira*, vol. 22, no. 3, p. 44–3, 1997.

CAMARGO, A.; CAMARGO, F. d.; ALVES, H.; CAMARGO FILHO, W. d. “Desenvolvimento do sistema agroindustrial do tomate,” *Informações econômicas* ^, vol. 36, no. 11, p. 53–65, 2006.

CARRIJO, O.; SOUZA, R. de; MAROUELLI, W.; ANDRADE, R. de. “Fertirrigação de hortaliças.” *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 2005.

COSTA, I. B. “Avaliação de rizobactérias de solo antrópico, na promoção de crescimento e na indução de resistência contra mancha-alvo do tomateiro (*solanum lycopersicum* l.)” 2012.

DAHLKE, I. ; GUERRA, D. ; SOUZA, E. L. de; ENIVAR, M.; LANZANOVA,; R. E. G. B.; RAMIRES, M. F. “Desempenho produtivo do tomateiro sob cultivo protegido utilizando caldas agroecológicas,” ^ *Revista Cultura Agronomica* ^, vol. 28, no. 2, pp. 204–214, 2019. ISSN 2446-8355. <http://dx.doi.org/10.32929/2446-8355.2019>.

DONTHU, N.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, D.; PANDEY, N.; LIM, W. M. “How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines,” *Journal of Business Research*, vol. 133, p. 285–296, 2021.

DOS SANTOS, D. K. N.; VILAMIL, E. S.; DEMOSTHENES, L. C. R.; NETO, P. D. Q. C. Incidência de doenças causadas por fungos em guaranazeiros em propriedades rurais de Urucará, Amazonas Incidence of diseases caused by fungi in guarana plants in rural properties of Urucará, Amazonas. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 4, p. 27281-27295, 2022.

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

DUMA, M.; ALSINA, I.; DUBOVA, L.; ERDBERGA, I. “Chemical composition of tomatoes depending on the stage of ripening,” *Chemical Technology*, vol. 66, no. 1, p. 24–28, 2015.

FAO. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. (2022) *Fao statistical yearbook*. new york, 2019. [Online]. Available: <http://www.fao.org/statistics/en/>. Acessado em: 02/01/2022.

FERREIRA, D. F. “Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar,” *Brazilian Journal of Biometrics*, vol. 37, no. 4, p. 529–535, 2019.

GABARDO, G.; DALLA PRIA, M.; PRESTES, A. M. C.; DA SILVA, H. L. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos

fitopatogênicos in vitro. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 8, p. 55870-55885, 2020

IMRAN, M.; ABO-ELYOUSR, K. A.; MOUSA, M. A.; SAAD, M. M. "A study on the synergetic effect of bacillus amyloliquefaciens and dipotassium phosphate on alternaria solani causing early blight disease of tomato," *European Journal of Plant Pathology*, vol. 162, no. 1, p. 63–77, 2022.

LEE, S.-H.; MARCHIONNI, I.; BEZAIRE, M.; VARGA, C.; DANIELSON, N.; LOVETTBARRON, M.; LOSONCZY, A.; SOLTESZ, I. "Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells," *Neuron*, vol. 82, no. 5, p. 1129–1144, 2014.

LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBAK, V. "Eficacia relativa ´ de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murchabacteriana," *Horticultura Brasileira*, vol. 33, p. 125–130, 2015.

LOPES, C.; ROSSATO, M. "Diagnostico de ralstonia solanacearum em ´ tomateiro." *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*. 2013.

LOPEZ, S. M.; PASTORINO, G. N.; BALATTI, P. A. "Volatile organic ´ compounds profile synthesized and released by endophytes of tomato (solanum lycopersici l.) and their antagonistic role," *Archives of Microbiology*, vol. 203, no. 4, p. 1383–1397, 2021.

MACKENZIE, K. J.; SUMABAT, L. G.; XAVIER, K. V.; Vallad, G. E. "A review of corynespora cassicola and its increasing relevance to tomato in florida," *Plant Health Progress*, vol. 19, no. 4, p. 303–309, 2018.

MAKISHIMA, N.; CARRIJO, O. "Cultivo protegido do tomateiro." *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 1998.

OLIVEIRA, A. P.; SABINO, S.; GANDINE, S.; MOULIN, T.; AMARAL, A. "Importancia das actinobact ^ erias em processos ecol ´ ogicos, industriais ´ e economicos," ^ *Enciclopedia Biosfera ´*, vol. 10, no. 18, 2014.

OLIVEIRA, M. F.; DA SILVA; M. G.; VAN DER SAND, S. T. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of Streptomyces sp. R18 (6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology*, vol. 161, nº 7, p. 565-572, 2010.

PERNEZNY, K.; SIMONE, G. W. "Target spot of several vegetable crops," *Plant Pathology Fact Sheet*, p. 39–44, 1999.

RIDDECH, N.; SRITONGON, K. PHIBUNWATTHANAWONG, T. "Production of plant growth promoting antagonistic rhizobacteria to promote cucumber growth and control leaf spot disease (corynespora cassicola)," *Chiang Mai Journal of Sciences*, vol. 44, no. 1, p. 72–82, 2017.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. "Controle biologico da murcha do ´ tomateiro causada por ralstonia solanacearum e fusarium oxysporum f. sp. lycopersici por rizobacterias," ´ *Tropical Plant Pathology*, vol. 38, p. 423–430, 2013.

RODRIGUES, F.; NUNES, A. C. P.; CARVALHO, D. D. C.; RIBEIRO, M. C. “Indução de tolerância à marcha bacteriana em híbridos de tomates por aplicação de giberelina,” *Revista de Ciências Agroveterinárias*, vol. 17, no. 1, p. 54–60, 2018.

TERAMOTO, A.; PARISI, M.; CUNHA, M. G. “Caracterização fisiológica de isolados de *corynespora cassicola*,” *Tropical Plant Pathology*, vol. 38, p. 313–322, 2013.

TOYOTA, K.; YOKOTA, K. et al., “Characterization of possible bacterial biocontrol agents, isolated from various plants in indonesia, against bacterial wilt and damping-off of tomato,” *Soil Microorganisms*, vol. 69, no. 1, p. 39–47, 2015.

UDUTALAPALLY, V.; MOHANTY, S. P.; PALLAGANI, V.; KHANDELWAL, V. “scrop: A novel device for sustainable automatic disease prediction, crop selection, and irrigation in internet-of-agro-things for smart agriculture,” *IEEE Sensors Journal*, vol. 21, no. 16, p. 17 525–17 538, 2020.

VERGNES, S.; GAYRARD, D.; VEYSSIERE, M.; TOULOTTE, J.; MARTINEZ, Y.; DU-MONT, V.; BOUCHEZ, O.; REY, T.; DUMAS, B. “Phyllosphere colonization by a soil streptomyces sp. promotes plant defense responses against fungal infection,” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 33, no. 2, p. 223–234, 2020.

YAMUNARANI, K.; SUNDARAM, A.; PANDIYAN, M. “Streptomycetes as a potential biocontrol agent,” *J. Entomol. Zool. Stud*, vol. 7, p. 637–644, 2019.

ZHU, H.; HE, Z.; JIA, Y. “A novel approach to multiple sequence alignment using multiobjective evolutionary algorithm based on decomposition,” *IEEE journal of biomedical and health informatics*, vol. 20, no. 2, p. 717–727, 2015.