

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA

MANOELA GUIMARÃES FERREIRA DA PAZ

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Ralstonia solanacearum* NA CULTURA
DO TABACO NO RECÔNCAVO BAIANO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MAIO – 2023

MANOELA GUIMARÃES FERREIRA DA PAZ

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Ralstonia solanacearum* NA CULTURA
DO TABACO NO RECÔNCAVO BAIANO**

Bacharel em Agronomia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária na Área de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Leilane Silveira Dávila

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MAIO – 2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

P348c	<p>Paz, Manoela Guimarães Ferreira da. Controle biológico de <i>Ralstonia solanacearum</i> na cultura do tabaco no Recôncavo Baiano / Manoela Guimarães Ferreira da Paz. _ Cruz das Almas, BA, 2023. 60f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade. Coorientadora: Prof. Dra. Leilane Silveira Dávila.</p> <p>1.Pragas agrícolas – Fumo. 2.Fumo – Controle biológico. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 581.2</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

FOLHA DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA - UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Ralstonia solanacearum* NA CULTURA DO TABACO NO RECÔNCAVO BAIANO

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de Manoela
Guimarães Ferreira da Paz

Aprovado em: 30 de maio de 2023



Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
Orientador



Prof. Dr. Leandro de Souza Rocha
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
Examinador Interno



Prof. Dra. Thatyane Pereira de Sousa
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico esse projeto à minha mãe Rosineide Souza Guimarães, à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ser minha base, força e o símbolo de que tudo é possível de ser conquistado, bastando ter fé e amor.

A Universidade Federal do Recôncavo Baiano, por conceder um curso de Mestrado Profissional, oportunizando pessoas que necessitam trabalhar a ter acesso a um mestrado pautado em resoluções de problemas práticos, não deixando de respaldar os aspectos científicos.

Ao meu orientador Eduardo Chumbinho pela orientação e tranquilidade na condução do Mestrado.

A professora Leilane Silveira pelas orientações em laboratório e campo, e por ter me estimulado em todo o processo, me inspirando a admirar a Fitopatologia.

Aos meus colegas de trabalho por todo suporte durante o mestrado.

A minha irmã e amiga Railda Santos, por me motivar nos momentos mais difíceis e por me apoiar durante o mestrado.

EPÍGRAFE

“Uma mente que se abre a uma nova ideia, jamais retornará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

PAZ, Manoela Guimarães Ferreira da, **Controle biológico de *Ralstonia solanacearum* na cultura do tabaco no Recôncavo Baiano.**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – Ba, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade.

RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia dos produtos comerciais Biotrichomax® e Chevelle® à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., no controle de *R. solanacearum* *in vitro* e *in vivo*, bem como avaliar o efeito sinérgico do controle biológico associado a prática de calagem em condições de campo. Os tratamentos utilizados foram: Chevelle® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L); Biotrichomax® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L) e a mistura dos dois produtos nas mesmas doses. Utilizou-se o teste de dupla camada para avaliar o antagonismo dos produtos comerciais com *R. solanacearum*. O delineamento foi inteiramente casualizado, com doze tratamentos e três repetições. Após 48 horas de incubação, foi analisada a formação de halo de inibição. Foram realizados dois experimentos em campo, em área com histórico do patógeno. O primeiro experimento foi realizado com os tratamentos à base de produtos biológicos, avaliando apenas a incidência da doença nos diferentes tratamentos. O segundo experimento utilizou-se os mesmos tratamentos biológicos, porém associados ou não com a aplicação de calcário. O delineamento do primeiro experimento em campo foi em blocos casualizados e o segundo em blocos casualizados em parcelas subdivididas no espaço, com dez tratamentos e quatro repetições. Ambos experimentos tinham dez tratamentos e quatro repetições. Avaliou-se a incidência da doença aos 50 dias após o transplante. Nos testes *in vitro*, Biotrichomax® não apresentou halo de inibição em nenhuma das doses testadas. O produto Chevelle® apresentou em todas as concentrações, halo de inibição, sendo que na concentração 2 mL/L apresentou maior média do halo de inibição. Os tratamentos combinados com Chevelle® + Biotrichomax®, apresentaram halo de inibição, no entanto não diferiram significativamente dos tratamentos com Chevelle®. Já em campo, os produtos não demonstraram efeito na incidência da doença. A inclusão da calagem resultou em uma redução significativa na incidência de *R. solanacearum* em comparação com a área sem calagem. Os dados demonstram que o uso de produtos biológicos associados ao aumento do pH do solo mostra-se uma prática promissora para o manejo da murcha do Tabaco causado por *R. solanacearum*.

Palavras-Chave: murcha bacteriana; antagonismo; *Nicotiana tabacum*; calagem.

PAZ, Manoela Guimarães Ferreira da, **Biological control of *Ralstonia solanacearum* in tobacco growing in the Reconcavo Baiano**
Federal University of Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – Ba, 2023.
Advisor: Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of commercial products Biotrichomax® and Chevelle®, based on *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp, in the control of *R. solanacearum* *in vitro* and *in vivo*, as well as the synergistic effect of biological control associated with liming practice under field conditions. The treatments used were: Chevelle® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L); Biotrichomax® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L) and a combination of both products at the same doses. The double-layer test was used to evaluate the antagonism of the commercial products with *R. solanacearum*. The experimental design was completely randomized with twelve treatments and three replications. After 48 hours of incubation, the formation of inhibition halo was analyzed. Two field experiments were conducted in an area with a history of the pathogen. The first experiment was carried out with treatments based on biological products, evaluating only the disease incidence in different treatments. The second experiment used the same biological treatments, but associated or not with the application of lime. The design of the first field experiment was in randomized blocks, and the second was in randomized blocks in split-plot design, with ten treatments and four replications. Both experiments had ten treatments and four replications. Disease incidence was evaluated 50 days after transplantation. In the *in vitro* tests, Biotrichomax® did not show any inhibition halo at any of the tested doses. The product Chevelle® showed inhibition halos at all concentrations, with the highest average inhibition halo observed at the 2 mL/L concentration. The treatments combined with Chevelle® + Biotrichomax® showed inhibition halos, but did not differ significantly from the treatments with Chevelle® alone. However, in the field, the products did not demonstrate an effect on disease incidence. The inclusion of liming resulted in a significant reduction in the incidence of *R. solanacearum* compared to the area without liming. The data demonstrate that the use of biological products associated with an increase in soil pH appears to be a promising practice for the management of Tobacco wilt caused by *R. solanacearum*.

Keywords: bacterial wilt, antagonism, *Nicotiana tabacum*, liming.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Antagonismo <i>in vitro</i> pelo método de difusão de dupla camada contra <i>Ralstonia solanacearu</i> . (A) Chevelle® na concentração de 2 mL/L, (B) mistura dos produtos comerciais com Chevelle® +Biotrichomax® na dose de 1,5 mL/L	46
Figura 2 – Boxplot da incidência média de <i>R. solanacearum</i> em plantas cultivadas com e sem calcário e com aplicação de controle biológico no experimento 2. C (calcário); S (sem calcário)	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Média do comprimento (mm) do halo de inibição	48
Tabela 2 – Probabilidade de formação de halo em relação aos tratamentos empregados	49
Tabela 3 – Incidência de <i>R. solanacearum</i> no experimento de campo 1 (período 22/11/2021 a 11/02/2022) com a dosagem de 1g/ L água	50
Tabela 4 – Incidência de <i>R. solanacearum</i> no experimento de campo 2, em plantas cultivadas sem e com calcário e com aplicação de controle biológico	51
Tabela 5 – Teste de qualidade do tabaco dos experimentos de campo	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitro

BA – Bahia

g – grama

g/L – grama por litro

ha – hectares

L – litro

mL – mililitro

mm – milímetros

pH – potencial hidrogeniônico

spp. – Espécie

t/ha – toneladas por hectare

UFC/ g – Unidade formadora de colônia por grama

UFC/ mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

LISTA DE SÍMBOLOS

β – beta

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

% – porcentagem

® – marca registrada

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 A CULTURA DO TABACO	18
3.2 MURCHA BACTERIANA	18
3.3 A IMPORTÂNCIA DA CALAGEM NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DO SOLO	20
3.4 CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA BACTERIANA	22
3.4.1 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de controle biológico	24
3.4.2 <i>Bacillus</i> spp. como agente de controle biológico	25
ARTIGO 1	28
Efficiency of commercial products based on <i>Trichoderma</i> spp. and <i>Bacillus</i> spp. in the control of <i>Ralstonia solanacearum</i> in <i>Nicotiana tabacum</i> L.	29
4 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Nicotiana tabacum L., popularmente conhecida como fumo ou tabaco, é um dos cultivos de grande importância no cenário nacional, pois além de ser uma cultura rentável, contribui socialmente para geração de empregos (HILSINGER, 2016). Segundo a Associação dos fumicultores do Brasil-AFUBRA (2020), na safra 19/20 foram gerados aproximadamente 600 mil empregos diretos e a produção contou com cerca de 160.000 produtores, com destaque maior para a região Sul. No Nordeste, na safra 19/20 a área plantada com tabaco foi de 22.316 hectares com uma produção de 30.185 toneladas de tabaco, sendo que 10.325 toneladas foram produzidas na Bahia, gerando cerca de 4,5 mil empregos diretos (KIST et al., 2020). A Bahia tem a produção de tabaco destinada a capas de cigarrilhas e charutos, o que por muitos anos colocou a região conhecida como Mata Fina como uma das mais propícias para esta cultura (NARDI, 2013).

No entanto, a produção de tabaco pode ser comprometida por diversos fatores, como a incidência de pragas e doenças (YANG et al, 2019). Doenças foliares como cercosporiose e mancha aureolada na maioria das vezes provocam o descarte de folhas que seriam destinadas para capas, assim como, viroses afetam o sabor e aroma. Já bactérias, além desses danos também provocam o apodrecimento das folhas.

A murcha bacteriana, causada pela bactéria de solo *Ralstonia solanacearum*, é um dos patógenos que mais confere prejuízos em cultivos de tabaco, principalmente quando o uso da terra é intensivo, quando as perdas podem chegar até 100% (AHMED et al., 2022). *R. solanacearum* possui uma ampla distribuição geográfica (trópicos, subtropicais, regiões temperadas quentes), apresenta uma grande gama de hospedeiros, podendo infectar até 250 espécies, e por se tratar de um patógeno de solo, uma vez estabelecido, pode permanecer no solo por anos (MIHOVILOVICH et al., 2017).

R. solanacearum penetra na planta através de ferimentos e aberturas naturais nas raízes, multiplica-se nos espaços intercelulares e percorre o xilema, causando o

bloqueio do sistema vascular. Com o sistema vascular obstruído, tem-se o sintoma de murcha, típico da infecção por este patógeno (XUE; LOZANO-DURÁN; MACHO, 2020).

Este patossistema é complexo, pois, uma vez estabelecido em uma área, o controle e manejo da doença torna-se difícil (MENG, 2013). Medidas de controle e convívio com a murcha bacteriana, como o uso de variedades resistentes, rotação de culturas, controle químico e correção do solo são bastante utilizadas, porém não são consideradas suficientes, o que torna o controle biológico uma forma promissora de reduzir a severidade da murcha bacteriana (TAHIR et al., 2017; CAI et al., 2018). Microrganismos antagonistas, como espécies de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. têm sido relatados como agentes de controle biológico eficazes na redução da incidência da murcha bacteriana (KONAPPA et al., 2018). Entretanto, existem poucos relatos da utilização desses microrganismos na cultura do tabaco, principalmente no Brasil.

Diante do exposto, faz necessário compreender se a utilização de agentes de controle biológico como *Trichoderma* spp e *Bacillus* spp. apresentam eficácia no controle de *R. solanacearum* em tabaco, assim como a associação entre o uso de agentes de controle biológico e calagem apresenta algum efeito sobre a doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de uso do controle biológico de *Ralstonia solanacearum* na cultura do tabaco no Recôncavo baiano, e se há interação sinérgica do controle biológico associado a prática de calagem em condições de campo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a eficiência dos produtos biológicos à base de *Bacillus amyloliquefaciens* (Chevelle®) e o produto composto pela mistura de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma koningiopsis* (Biotrichomax®) (*Trichoderma* e *Bacillus* spp) no controle de *R. solanacearum in vitro*.
- Avaliar em campo a eficiência de controle de *R. solanacearum* por *Bacillus amyloliquefaciens* (Chevelle®) e o produto composto pela mistura de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma koningiopsis* (Biotrichomax®) (*Trichoderma* e *Bacillus* spp.) quando aplicados no solo.
- Comparar a incidência de *R. solanacearum* em solo com e sem calagem associado ao produto Chevelle® (*Bacillus amyloliquefaciens*) e o produto Biotrichomax (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma koningiopsis*).
- Avaliar se o uso de agentes de controle biológico e da calagem para o manejo de *R. solanacearum* afetam a qualidade sensorial das folhas do tabaco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A CULTURA DO TABACO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) pertence à família das solanáceas, é originário da América, mais precisamente nos Andes bolivianos, onde os primeiros povos a consumi-lo foram os indígenas, que usavam as folhas para fins medicinais e em rituais. Seu processo de expansão ocorreu no período que os europeus percorriam as Américas e aos poucos o uso foi sendo popularizado (SINDITABACO, 2019).

A cultura do tabaco é considerada uma atividade agrícola de grande importância econômica e social (MA et al., 2018), destacando a China, o Brasil, a Índia, os Estados Unidos e o Zimbábue como principais produtores (MENDES et al., 2015; KIST et al., 2016; SANTOS, 2017). O Brasil é o segundo maior produtor, sendo que em área plantada foi 363.233 hectares em 2019, destacando-se as regiões Sul e Nordeste (IBGE, 2019). No Nordeste, a Bahia ocupa a segunda posição em área plantada e maior produção, sendo respectivamente, 7632 ha de tabaco e 10.325 toneladas produzidas. A região do Recôncavo Baiano representa aproximadamente 18% de área plantada de fumo na Bahia (IBGE, 2019).

Esse “Território de Identidade” é considerado historicamente como produtor de tabaco por suas condições edafoclimáticas serem propícias a esta cultura, sendo as principais variedades utilizadas nos cultivos: Brasil-Bahia e Sumatra (NARDI, 2013). Os municípios do Recôncavo com destaque na produção de tabaco são Cabaceiras do Paraguaçu e Governador Mangabeira, com 590 e 453 toneladas, respectivamente (IBGE, 2021). Apesar de apresentar um aumento da produção no cenário mundial, muitas lavouras são perdidas em decorrência de doenças, principalmente a murcha bacteriana, causado por *R. solanacearum* (GENIN; DENNY, 2012).

3.2 MURCHA BACTERIANA

A murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*, é predominante de regiões tropicais, e é uma das doenças que vem assolando cultivos de tabaco em vários

países, provocando grandes perdas na produção (CHEN, et al.,2016; MA, et al., 2018). É uma bactéria gram-negativa que apresenta grande diversidade genética, com uma intensa gama de hospedeiros, atingindo espécies pertencentes a mais de 50 famílias botânicas, afetando principalmente cultivos onde há predominância de solanáceas, como batata, tomate e tabaco, muito embora outras espécies são hospedeiras, a exemplo de espécies de plantas daninhas (GENIN; DENNY, 2012). É classificada em raças e biovars, sendo que a raça é relacionada ao tipo de hospedeiro que este patógeno atua e as biovars se refere aos dissacarídeos utilizados, sendo que para as solanáceas a raça 1 é atribuída (LIU et al., 2017).

R.solanacearum é uma bactéria de solo e sua principal porta de entrada na planta se dá através de aberturas naturais ou ferimentos nas raízes (TAHIR et al., 2017). Ao acessar o hospedeiro, age colonizando o vaso condutor do xilema, processo que se caracteriza pela produção de polissacarídeos extracelulares que em quantidade interrompem o fluxo de água, fazendo com que as plantas infectadas, apresentem processo de atrofiamento e amarelecimento, até a evolução para a morte da planta (LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018).

Jiang et al. (2017) demonstram que a incidência da murcha bacteriana pode chegar de 15-35% em tabaco, e este número pode ser maior, chegando a 75% de plantas afetadas quando associada à patógenos radiculares, como *Phytophthora nicotianae*. Em áreas onde predomina apenas a cultura do tabaco, sem alternância de outras espécies, ocorre alta incidência da doença, podendo provocar perdas de produtividade de até 60% (CAI et al., 2021) e este número se torna maior quando relacionado à fatores ambientais, como altas temperaturas, que ocasiona crescimento acelerado de *R. solanacearum* assim como maior severidade da doença (WANG et al., 2020).

O controle da murcha bacteriana é extremamente difícil devido à grande diversidade genética, ampla gama de hospedeiros e longo período de sobrevivência no solo, exigindo diversas estratégias pautadas no manejo integrado, como desenvolvimento de variedades resistentes, emprego de bactericidas, rotação de culturas, controle biológico e melhoria dos atributos químicos do solo através da calagem (HE et al., 2014; LI et al., 2017; O' BRIEN, 2017; MA et al., 2018; AHMED et al.; 2022; BASUKI; SUHARA; MAHAYU, 2022).

O desenvolvimento de variedades resistentes é uma das estratégias mais relevantes no controle de doenças. Em pesquisa para avaliar caráter de resistência à murcha bacteriana em tabaco em diferentes genótipos, Basuki; Suhara e Mahayu (2022) evidenciaram que o genótipo NtU2 apresentou potencial para servir de fonte de resistência para geração de variedades resistentes à doença. No entanto, apesar de ser um método promissor, o tempo para criar uma nova variedade é muito longo, pois envolve seleção de linhagens, cruzamentos, estudo de resistência ao patógeno, e garantia que não haverá redução do rendimento da cultura e nem impacto na qualidade (AHMED et al.; 2022).

O uso de bactericidas à base de tiazol de zinco e hidróxido de cobre foi relatado no controle de murcha bacteriana nas culturas de amendoim e gengibre, sendo que neste último houve redução da incidência em torno de 20% quando comparada ao que não recebeu nenhum tipo de tratamento (JIBAT; GETU, 2020). Entretanto, o emprego de químicos é relatado como prejudicial ao meio ambiente, além do desenvolvimento de resistência do patógeno (AHMED et al., 2022).

O uso de microrganismos antagonistas e melhorias na qualidade química do solo através da calagem, demonstram ser estratégias promissoras por serem sustentáveis e mais acessíveis. Os agentes de controle biológico para murcha bacteriana são organismos advindos da natureza e que não impactam no meio ambiente, atuando nas plantas, promovendo crescimento, induzindo resistência do hospedeiro e aumento da absorção de nutrientes ou no próprio patógeno devido a diferentes mecanismos de ação, como competição, predação e antibiose (TAHIR et al., 2017; CAO et al., 2018; AHMED et al., 2022). A calagem atua na correção do pH do solo, reduzindo a acidez, criando um ambiente mais favorável para os microrganismos benéficos (GURMESSA et al., 2021).

3.3 A IMPORTÂNCIA DA CALAGEM NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DO SOLO

A utilização intensa e indiscriminada de fertilizantes minerais impacta diretamente na qualidade do solo, provocando a sua acidificação e interferindo nas comunidades microbianas (WAN et al., 2020). As comunidades microbianas são essenciais na

interação solo e planta, pois atuam na ciclagem de nutrientes, através da degradação de restos vegetais, na fixação e disponibilização de nutrientes e nas defesas das plantas contra patógenos (KOSHILA RAVI et al., 2019). Wan et al. (2020), avaliando a correlação entre acidificação do solo e comunidade microbiana, analisaram amostras de solos com $\text{pH} < 5,5$ e $\text{pH} > 5,5$ para a identificação dos filões dos microorganismos presentes nas duas condições por meio do sequenciamento do DNA ribossomal. Eles constataram que a acidez do solo impactou a diversidade de espécies microbianas, em que solos com $\text{pH} < 5,5$ havia abundância de Firmicutes, Actinobacteria dentre outros, afetando a ciclagem de nutrientes como C, N, P e S. Em solos com $\text{pH} > 5,5$ a abundância dos filões foi de Nitrospirae, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, entre outros, considerando que o filo Nitrospirae é importante para o ciclo do nitrogênio.

A acidez do solo causa aumento de alumínio trocável que favorece uma série de efeitos fitotóxicos às plantas, como redução no crescimento radicular e da planta, aumento de espécies reativas de oxigênio, danos às paredes celulares da raiz e redução da absorção de água e nutrientes (HOLLAND et al., 2018; OFOE et al., 2022). Com estes efeitos deletérios, a planta não consegue desenvolver suas atividades fisiológicas da forma plena, o que a torna propensa à entrada de patógenos (ZHAO; SHEN, 2018). Desta forma, problemas de acidificação podem ser corrigidos através da prática da calagem, que promove redução desses elementos tóxicos, disponibilização de cálcio e magnésio e aumento da absorção de nutrientes pelas plantas (BOSSOLANI et al., 2020).

A prática de calagem por corrigir o pH do solo e disponibilizar cálcio, afeta positivamente vários processos químicos e biológicos que influenciam na saúde do solo (BRADY; WEIL, 2008) e conseqüentemente no crescimento e desenvolvimento das plantas (HOLLAND et al., 2018). O cálcio tem importante função na composição estrutural da planta, assim uma planta com baixo teor deste nutriente, apresenta a parede celular enfraquecida e maior suscetibilidade a microorganismos patogênicos (THOR, 2019). Isto é evidenciado no trabalho de He et al. (2014), na cultura do tabaco, que observaram que a atividade da pectinase, enzima hidrolítica produzida por *R. solanacearum*, cuja função é a hidrólise da parede celular das plantas foi reduzida quando exposta a solução contendo cálcio.

Em experimento de campo com tabaco, Shen et al. (2018) notaram que solos ácidos apresentaram maior incidência de murcha bacteriana, quando comparado a solos que foram corrigidos e isto pode estar correlacionado à adaptabilidade de *R. solanacearum* a solos ácidos, ao impacto da acidez na redução da diversidade e riqueza microbiana, aumentando-se a população de bactérias patogênicas. Li et al. (2017) avaliando a relação da acidez do solo com o desenvolvimento de murcha bacteriana em tabaco, comprovaram que a doença se desenvolveu rapidamente em solos com pH entre 4,5 a 5,5, assim como o tabaco tornou-se mais suscetível a *R. solanacearum* e o crescimento de bactérias antagônicas como *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* foram inibidos em condições de solos ácidos.

Em uma pesquisa avaliando o controle de *R. solanacearum* no tabaco através de uma fonte de cálcio (ciamida de cálcio) e controle biológico com *Bacillus amyloliquefaciens* ZM9, Hu et al. (2021) observaram que a incidência da doença foi reduzida em 65,79% quando os tratamentos foram associados e os motivos do controle estão relacionados ao aumento do pH do solo, aumento na diversidade microbiana e microorganismos benéficos, que atuaram no sistema solo-planta trazendo melhorias nas condições físico-químicas do solo, melhorando a absorção de nutrientes e conseqüentemente auxiliando o fortalecimento das plantas contra o patógeno.

Assim, a prática da calagem torna-se importante, pois reduz a acidez do solo, aumenta a população de microrganismos antagonistas, disponibiliza cálcio e atua no crescimento das plantas e nas defesas contra patógenos, podendo reduzir a incidência da murcha bacteriana (LI et al., 2017; HOLLAND et al., 2018; THOR, 2019).

3.4 CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA BACTERIANA

O controle da murcha bacteriana é extremamente difícil, pois o patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros, sobrevive no solo endofiticamente, é transportado pela água e apresenta uma relação direta com ervas daninhas (NION; TOYOTA, 2015).

Com as crescentes preocupações devido à liberação de resíduos provenientes de defensivos químicos, bem como seus impactos no meio ambiente, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com a utilização de produtos biológicos para controle de

doenças de plantas (CARMONA-HERNANDEZ et al., 2019).

O controle biológico de fitopatógenos consiste na utilização de microrganismos antagonistas como fungos e bactérias saprofíticos ou endofíticos, que quando associados à planta apresentam efeitos benéficos (O'BRIEN, 2017), pois são capazes de competir com patógenos utilizando diferentes mecanismos de ação, produzidos por meio dos efeitos diretos (competição, predação, mutualismo, parasitismo, antibiose) ou indiretos (indução de mecanismos de defesa da planta e promoção de crescimento) (AXEL et al., 2012).

Estratégias de biocontrole da murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* com base no efeito antagônico de agentes como *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. apresentam respostas promissoras no controle da murcha bacteriana (RAMESH; PHADKE, 2012). Em experimento realizado em casa de vegetação com plantas de tomate, Konappa et al. (2020) notaram que a incidência da murcha bacteriana foi de 54% (46% de proteção) em solo tratado com *B. amyloliquefaciens* IN937a em comparação com o controle que apresentou 97% de incidência de murcha bacteriana. Os autores verificaram que quando as sementes de tomates foram tratadas com *T. asperellum* T8, *T. harzianum* UNS35 e *T. viride* UNS42 também ocorreu uma redução de mais de 50% da incidência de murcha bacteriana e uma proteção contra a doença de mais 40% em comparação com o controle. Os resultados deste trabalho em campo enfatizam que os tratamentos com bactérias promotoras de crescimento e *Trichoderma*, promovem controle sobre a murcha bacteriana em plantas de tomate.

A associação de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. foi avaliada no controle de murcha bacteriana e foi demonstrado que o tratamento com a combinação desses microrganismos apresentou melhor controle da doença quando comparado ao uso isolado, o que pode estar relacionado aos diferentes nichos ocupados por estas espécies (MAKETON; APISITSANTIKUL; SIRIRAWEEKUL, 2008).

Em estudos de plantas de tomate cultivadas em campo Kariuki, Mutitu e Muiru, (2020) verificaram a redução na incidência de *Ralstonia solanacearum* de 93,17% e 92% nas plantas quando tratadas com *Bacillus* CB64 e isolado de *Trichoderma* T1, respectivamente. Os autores enfatizam que a redução da incidência da doença está relacionada com o potencial de adaptação do *Trichoderma* em condições extremas

do solo e a relação antagônica entre as cepas de *Bacillus* e *R. solanacearum* que ocorre na rizosfera.

A associação de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. foi avaliada no controle de murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* em tabaco, e foi demonstrado que o tratamento com a combinação desses microrganismos apresentou melhor controle da doença o que pode estar relacionado aos diferentes nichos ocupados por estas espécies (MAKETON; APISITSANTIKUL; SIRIRAWEEKUL, 2008).

3.4.1 *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico

Os fungos do gênero *Trichoderma* spp., são de vida livre e presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (SANTOS et al., 2012). São filamentosos, oportunistas e possuem relação simbiótica com as plantas (SOOD et al., 2020), podendo ser encontrados também em vegetais em decomposição (KUBICEK et al., 2008). São considerados como bioestimulantes, promovendo crescimento e o desenvolvimento das raízes, facilitando assim a absorção e utilização de nutrientes (KAPRI; TEWARI, 2010; HANNAN et al., 2013; CHAGAS et al., 2016).

Trichoderma spp., apresenta capacidade de realizar modificações genômicas e metabólicas durante o estabelecimento da raiz da planta hospedeira (GHAFFARI et al., 2016). Essas modificações podem incluir a ativação de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios, bem como genes relacionados ao transporte de nutrientes, transdução de sinal e resposta a estresses bióticos e abióticos (SINGH et al., 2018).

O potencial de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico é bastante estudado devido à capacidade de secretar metabólitos, que atuam como compostos antimicrobianos contra bactérias e fungos fitopatogênicos de solo (GUO et al., 2021). As principais estratégias de biocontrole que *Trichoderma* spp. tende a desenvolver contra fitopatógenos podem estar associadas ao parasitismo, competição, antibiose ou por atuar indiretamente induzindo a síntese de hormônios vegetais sobre a planta, melhorando o seu crescimento e desenvolvimento, e estimulando a produção de metabólitos secundários (KUMAR, 2013; ZHANG et al., 2017; KONAPPA et al. 2020)

que resultam no aumento da defesa da planta por meio da indução de resistência sistêmica (MUKHERJEE et al., 2018).

O uso de cepas de *Trichoderma* tem sido bastante explorada como alternativa no controle de doenças em plantas, principalmente em patógenos de solo que apresentam mecanismos de sobrevivência, como *R. solanacearum*. Em estudos recentes, Yan e Khan (2021) avaliando metabólitos fúngicos de *T. harzianum* para o manejo da murcha bacteriana em plantas de tomateiro tanto *in vitro* quanto *in vivo*, verificaram a atividade de metabólitos fúngicos com ação antibacteriana contra o patógeno, sendo que a concentração de 180 mg/mL apresentou maior halo de inibição. Os autores constataram que com o aumento das concentrações de metabólitos fúngicos em 9%, a severidade da murcha bacteriana em plantas de tomate decrescia quando aplicadas entre 3 e 6 dias antes do plantio. Observaram também, que esses metabólitos agiram diretamente nas células bacterianas causando degradação da parede celular, a desintegração das membranas e o vazamento do conteúdo celular.

Em experimento *in vitro* para avaliar a produção de compostos antimicrobianos produzidos por *T. harzianum*, *T. virens* e *T. Koningii* contra *R. solanacearum* na cultura do tomate, Guo et al. (2021) observaram que todos os tratamentos com *Trichoderma* produziram ação antimicrobiana contra *R. solanacearum*, sendo que *T. harzianum* apresentou maior halo de inibição, seguido de *T. virens* e *T. Koningii*. Os autores relatam que a ação antimicrobiana pode estar relacionada a desestruturação da parede celular da bactéria, promovendo inibição do seu crescimento.

Outros relatos destacam a inibição e redução da incidência da murcha bacteriana causada pelo patógeno *R. solanacearum*, em plantas de tomate. Em estudos, Konappa et al. (2018) avaliando o potencial de isolados de *T. asperellum* do solo rizosférico de tomateiros, observaram que mecanismos de ação como antibiose, competição por nutrientes e micoparasitismo, atuaram diretamente sobre o patógeno, devido a liberação de enzimas de defesa como celulase, quitinase β -1, 3 glucanase e protease. Além disso, foram observadas redução na incidência da doença na medida que as plantas apresentavam um bom crescimento e rendimento em condições de campo. Este fato pode estar relacionado com as propriedades promotoras do crescimento vegetal dos metabólitos de *Trichoderma* (GUO et al.,

2021).

3.4.2 *Bacillus* spp. como agente de controle biológico

As bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas, heterogêneas, aeróbicas e possuem a forma de bastonetes (FERREIRA; BETTIO, 2019). São denominadas rizobactérias promotoras de crescimento, por colonizarem as raízes das plantas e promoverem o crescimento vegetal (CHOUDHARY; JOHRI, 2009). O processo de colonização das raízes por *Bacillus* spp., ocorre por quimiotaxia, no qual, a bactéria apresenta genes quimiorreceptores que auxiliam no processo de estabelecimento e interação benéfica com as plantas (HASHEM; TABASSUM; ABD-ALLAH, 2019).

Essas bactérias são interessantes na produção agrícola por serem resistentes a condições ambientais adversas, devido à formação de endósporos, que são estruturas de resistência que conferem proteção em altas temperaturas, dessecação e contato com agentes químicos, permitindo a sua sobrevivência em ambientes inóspitos até encontrar condições adequadas para se tornarem ativas e exercer seu papel benéfico aos vegetais (NASCIMENTO, 2019).

São amplamente estudadas porque ao colonizar a rizosfera, atuam na produção de metabólitos que estimulam o crescimento das plantas, auxiliando no processo de solubilização de nutrientes, como o fósforo, produção de fitohormônios, além da proteção contra patógenos, através da indução de resistência, competição por espaço e nutrientes, assim como a produção de compostos antimicrobianos (ACHARI; RAMESH, 2019).

A produção de compostos antimicrobianos de *Bacillus*, como a surfactina, iturina e fengicina são aumentadas ao entrar em contato com o patógeno, desencadeando resistência sistêmica das plantas e garantindo maior proteção vegetal (CHOWDHURY et al., 2015). Cao et al. (2018) em experimento *in vitro*, isolaram os compostos que foram secretados por duas cepas de *B. velezensis* contra *R. solanacearum* em tomate e os identificaram através de cromatografia líquida de ultra-performance e detectaram a presença de iturina, fengicina e surfactina, que estavam relacionadas ao biocontrole.

Em estudo avaliando a murcha bacteriana no tabaco, Ahmed et al. (2022) realizaram

experimentos *in vitro* e *in vivo* com *B. amyloliquefaciens* WS-10 para compreender a formação de antimicrobianos e a incidência da doença quando essa rizobactéria interage com *R. solanacearum*, e notaram que *B. amyloliquefaciens* WS-10 apresentaram os lipopeptídeos fengicina, iturina, surfactina e bacilomicina D, que são enzimas que atuam na atividade antagônica. Os mesmos autores notaram também que esta cepa ao entrar em contato com a planta, colonizou as raízes eficientemente, formando biofilme e gerando os lipopetídeos, o que proporcionou redução da doença em 72%.

Uma pesquisa avaliando o impacto de *B. amyloliquefaciens*, *B. artrophaeus*, *B. cereus* e *B. pumulis* na fisiologia e indução de resistência de *R. solanacearum* em tabaco, Tahir et al. (2017) verificaram que todos os *Bacillus* utilizados no experimento *in vitro* inibiram *R. solanacearum*, mas a que apresentou maior halo de inibição foi *B. amyloliquefaciens* e com menor halo foi *B. pumulis*. Os autores também avaliaram os efeitos dos compostos orgânicos voláteis (COV) em *R. solanacearum* e notaram que estes compostos reduziram a virulência do patógeno, devido a uma redução da motilidade e quimiotaxia de *R. solanacearum*, dois fatores essenciais para conferir a virulência.

Embora medidas de controle biológico tenham sido desenvolvidas para controlar a murcha bacteriana para a maioria das culturas hospedeiras, são raros estudos no Brasil com a cultura do tabaco. Assim, uma melhor compreensão da ação de microrganismos como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de *R. solanacearum* nesta cultura é necessária.

ARTIGO 1

A ser submetido à revista Ciência Rural

Efficiency of commercial products based on *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. in the control of *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana tabacum* L.

Eficiência de produtos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de *Ralstonia solanacearum* em *Nicotiana tabacum* L.

Manoela Guimarães Ferreira da Paz¹, Eduardo Chumbinho de Andrade², Leilane Silveira D'Ávila³

ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of commercial products Biotrichomax® and Chevelle®, based on *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., in the control of *R. solanacearum* in *vitro* and in *vivo*, as well as the synergistic effect of biological control associated with liming practice under field conditions. The treatments used were: Chevelle® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L); Biotrichomax® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L) and a combination of both products at the same doses. The double-layer test was used to evaluate the antagonism of the commercial products with *R. solanacearum*. The experimental design was completely randomized with twelve treatments and three replications. After 48 hours of incubation, the formation of inhibition halo was analyzed. Two field experiments were conducted in an area with a history of the pathogen. The first experiment was carried out with treatments based on biological products, evaluating only the disease incidence in different treatments. The second experiment used the same biological treatments, but associated or not with the application of lime. The design of the first field experiment was in randomized blocks, and the second was in randomized blocks in split-plot design, with ten treatments and four replications. Both experiments had ten treatments and four replications. Disease incidence was evaluated 50 days after transplantation. In the in *vitro* tests, Biotrichomax® did not show any inhibition halo at any of the tested doses. The product

Chevelle® showed inhibition halos at all concentrations, with the highest average inhibition halo observed at the 2 mL/L concentration. The treatments combined with Chevelle® + Biotrichomax® showed inhibition halos, but did not differ significantly from the treatments with Chevelle® alone. However, in the field, the products did not demonstrate an effect on disease incidence. The inclusion of liming resulted in a significant reduction in the incidence of *R. solanacearum* compared to the area without liming. The data demonstrate that the use of biological products associated with an increase in soil pH appears to be a promising practice for the management of Tobacco wilt caused by *R. solanacearum*.

Key words: bacterial wilt, antagonism, *Nicotiana tabacum* L, biological control, liming

RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia dos produtos comerciais Biotrichomax® e Chevelle® à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., no controle de *R. solanacearum* *in vitro* e *in vivo*, bem como avaliar o efeito sinérgico do controle biológico associado a prática de calagem em condições de campo. Os tratamentos utilizados foram: Chevelle® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L) ; Biotrichomax® (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL/L) e a mistura dos dois produtos nas mesmas doses. Utilizou-se o teste de dupla camada para avaliar o antagonismo dos produtos comerciais com *R. solanacearum*. O delineamento foi inteiramente casualizado, com doze tratamentos e três repetições. Após 48 horas de incubação, foi analisada a formação de halo de inibição. Foram realizados dois experimentos em campo, em área com histórico do patógeno. O primeiro experimento foi realizado com os tratamentos à base de produtos biológicos, avaliando apenas à incidência da doença nos diferentes tratamentos. O segundo experimento utilizou-se os mesmos tratamentos biológicos, porém associados ou não com a aplicação de calcário. O delineamento do primeiro experimento em campo foi em blocos casualizados e o segundo em blocos casualizados em parcelas subdividas no espaço, com dez tratamentos e quatro repetições. Ambos experimentos

tinham dez tratamentos e quatro repetições. Avaliou-se a incidência da doença aos 50 dias após o transplântio. Nos testes *in vitro*, Biotrichomax® não apresentou halo de inibição em nenhuma das doses testadas. O produto Chevelle® apresentou em todas as concentrações, halo de inibição, sendo que na concentração 2 mL/L apresentou maior média do halo de inibição. Os tratamentos combinados com Chevelle® + Biotrichomax®, apresentaram halo de inibição, no entanto não diferiram significativamente dos tratamentos com Chevelle®. Já em campo, os produtos não demonstraram efeito na incidência da doença. A inclusão da calagem resultou em uma redução significativa na incidência de *R. solanacearum* em comparação com a área sem calagem. Os dados demonstram que o uso de produtos biológicos associados ao aumento do pH do solo mostra-se uma prática promissora para o manejo da murcha do Tabaco causado por *R. solanacearum*.

Palavras-chave: murcha bacteriana, antagonismo, *Nicotiana tabacum* L., controle biológico, calagem.

INTRODUÇÃO

O tabaco é um dos cultivos que apresenta grande importância econômica e social no Brasil, pois contribui para a geração de empregos e renda, tendo em vista que a maior parte dos trabalhos realizados na cultura são manuais, requerendo alta demanda por mão de obra (HILSINGER, 2016). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, e a Bahia, especificamente o Recôncavo Baiano, é a principal região produtora de tabaco destinado a produção de charutos, sendo reconhecida pela qualidade na produção de folhas para esta finalidade (SANTOS; DEPONTI, 2021).

O cultivo do tabaco apresenta problemas fitossanitários que podem gerar grandes prejuízos econômicos devido ao comprometimento da produção. Um exemplo que acomete vários países é a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (MA et al., 2018).

R. solanacearum apresenta grande diversidade genética, afetando muitas espécies de plantas e com ampla distribuição geográfica. A entrada na planta ocorre por ferimentos ou aberturas naturais nas raízes, colonizando o xilema e provocando sua obstrução devido a produção de polissacarídeos, acarretando na interrupção do fluxo de água. Neste processo, a planta começa a apresentar amarelecimento, murcha de folhas, necrosamento e a morte da planta (TAHIR et al., 2017; LOWE-POWER; KHOKHANI; ALLEN, 2018).

Uma das práticas que leva ao aumento da população de *R. solanacearum* é o uso intensivo do solo, que impacta negativamente seus atributos físicos, químicos e biológicos, resultando na piora na qualidade do solo. Na cultura do tabaco, diversas soluções vêm sendo debatidas para o manejo de *R. solanacearum*, como desenvolvimento de variedades resistentes, rotação de culturas, correção do solo e controle biológico (O'BRIEN, 2017; MA et al., 2018). No entanto, a obtenção de variedades resistentes é um processo complexo, principalmente no que concerne ao impacto na qualidade final do produto. Assim, correção do solo associado ao controle biológico se tornam alternativas viáveis e acessíveis para serem testadas nos cultivos.

A correção do solo, via aplicação de calcário, reduz a acidez do solo, impactando na diversidade microbiana do solo. Em experimentos com tabaco LI et al. (2017) comprovaram que a murcha bacteriana teve crescimento acelerado em solos com pH entre 4,5 e 5,5 e que o crescimento de bactérias antagonistas como *Bacillus cereus* foram inibidos em condições de solos ácidos.

Entende-se por controle biológico como a aplicação de microorganismos antagonistas que atuam sobre o patógeno através de efeitos diretos como competição, parasitismo e antibiose ou indiretos como a indução de resistência (AXEL et al., 2012; O'BRIEN, 2017). Diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar o potencial de uso de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de *R. solanacearum* em culturas como tomate, banana e tabaco, encontrando

resultados promissores (TAHIR et al., 2017; KONAPPA et al., 2018; CAO et al., 2018; KARIUKI, MUTITU E MUIRU, 2020; GUO et al., 2021).

Apesar de se observar boas perspectivas no uso de agentes de controle biológico contra *R. solanacearum*, não há registro de pesquisas com tabaco nas condições do Recôncavo baiano. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de uso do controle biológico de *Ralstonia solanacearum* na cultura do tabaco no Recôncavo baiano, e se há interação sinérgica do controle biológico associado a prática de calagem em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e análise para identificação da espécie

As plantas de tabaco com sintomatologia de murcha bacteriana foram coletadas nas áreas de plantio com alta severidade da doença, na Fazenda Capivari, no município de Governador Mangabeira- BA. As amostras foram enviadas para o Laboratório de diagnóstico Fitossanitário Agrônômica, no Rio Grande do Sul, para identificação da espécie.

*Isolamento de *Ralstonia solanacearum**

Com a identificação da espécie, as plantas foram encaminhadas para a Clínica Fitossanitária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Os caules foram cortados, mergulhados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 0,5% e lavados com água destilada por 30 segundos para cada etapa (ALFENAS; MAFIA, 2016). Após este processo, os fragmentos foram repicados em placas de Petri contendo meio Ágar nutriente e incubados a 25°C por 48 horas no escuro. Após o crescimento em meio de cultura, preparou-se suspensão concentrada em água estéril de *R. solanacearum*, que foi mantida em temperatura ambiente (ROMEIRO, 2005).

Teste de concentração dos produtos biológicos

Foram enviadas amostras dos produtos biológicos Chevelle® e Biotrichomax® para o laboratório Agrônômica no Rio Grande do Sul. Este laboratório foi responsável pelo teste de concentração e pureza.

Experimento in vitro para estudo de atividade antagônica

O teste de antagonismo foi feito no laboratório da Clínica Fitossanitária da UFRB, utilizando dois produtos biológicos comerciais, sendo Chevelle® (Koppert), a base de *Bacillus amyloliquefaciens* com 1×10^{10} UFC/g e Biotrichomax® (Dillon biotecnologia) composto por *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* e *T. koningiopsis* com 1×10^{11} UFC/mL e a mistura deles em diferentes dosagens, compondo doze tratamentos, com três repetições, com quatro colônias por repetição. O produto Chevelle® foi preparado por meio da diluição em água na proporção de 1 g/mL. Os tratamentos utilizados foram: Chevelle® 0,5 mL/L, 1,0 mL/L; 1,5 mL/L, 2,0 mL/L; Biotrichomax® a 0,5mL/L, 1,0 mL/L, 1,5mL/L, 2,0 mL/L; a mistura dos dois produtos nas mesmas doses e os controles contendo somente a bactéria *R. solanacearum* em meio de cultura e os produtos nas concentrações indicadas sem a presença do patógeno.

Uma alíquota de 10 uL de cada tratamento foi transferida para uma placa de Petri em quatro pontos equidistantes contendo meio ágar nutriente. As placas foram incubadas por 48 horas, a 28 °C, até apresentar crescimento. Em câmara de fluxo laminar as placas foram invertidas e cada tampa foi forrada com discos de papel filtro de 90 mm. Com auxílio de uma micropipeta foi adicionado 1 mL de clorofórmio aos discos de papel para cessar o crescimento bacteriano. Após 20 minutos os discos de papel foram removidos e as placas voltadas para a posição normal com as tampas entreabertas por 30 minutos para a eliminação dos resíduos de clorofórmio (KAWAGUCHI; KONDO; INOUE, 2012).

Preparou-se uma suspensão de *R. solanacearum* isolada de tabaco na concentração de 1×10^8 UFC/mL de onde retirou-se 25µL que foram adicionados a 5 mL de meio ágar nutriente.

O meio com *R. solanacearum* foi sobreposto ao meio que continha os tratamentos. Após 48 horas de incubação, foi analisado formação de halo de inibição e medição de seu comprimento com auxílio de régua. O delineamento foi inteiramente casualizado, com doze tratamentos e três repetições, sendo que em cada repetição havia quatro colônias por placas.

Experimento de campo e manejo da cultura

O experimento de campo foi realizado em campos de cultivo contínuo de tabaco, com alta incidência de *R. solanacearum* no município de Governador Mangabeira- BA (12°38'27.02''S, 39°04'03.52'O).

Foram realizados dois experimentos de campo em épocas distintas. O experimento 1 foi implantado no dia 22/11/2021 ficando no campo até 11/02/2022. A dosagem utilizada foi de 1 g/ L de água do produto comercial Chevelle® e 1,0 mL/ L de água do produto comercial Biotrichomax®, cujo modo de aplicação foi via drench.

O experimento 2 foi implantado em 13/01/2022 ficando no campo até 01/04/2022. Neste experimento foi utilizada a dosagem de 2g/ L de água do produto comercial Chevelle® e 2,0 mL/ L de água do produto comercial Biotrichomax®, com aplicação dos produtos via drench. O delineamento foi em blocos casualizados em parcela subdivida no espaço, com as plantas cultivadas no solo sem calcário e com calcário (1000 kg/ha) nas parcelas e os controles biológicos nas subparcelas, com quatro repetições. A descrição dos tratamentos está descrita abaixo:

T0= Testemunha

T1= Biotrichomax® aplicado pré-plantio

T2= Biotrichomax® aplicado pós-plantio

T3= Biotrichomax® aplicado pré e pós-plantio

T4= Chevelle® aplicado pré-plantio

T5= Chevelle® aplicado pós-plantio

T6= Chevelle® aplicado pré e pós-plantio

T7= Biotrichomax® + Chevelle® aplicado pré-plantio

T8= Biotrichomax® + Chevelle® aplicado pós-plantio

T9= Biotrichomax® + Chevelle® aplicado pré e pós-plantio

Em todos os experimentos as avaliações foram realizadas quanto à incidência da doença (nº de plantas com sintomas de murcha), sendo contabilizadas o total das plantas doentes aos 50 dias após o transplante. Abaixo segue o cálculo da incidência de acordo com ZHOU et al. (2021):

$$\% \text{ incidência} = \frac{\text{número de plantas com } Ralstonia * 100}{\text{número total de plantas}}$$

Classificação das folhas de tabaco quanto à qualidade

A partir dos 55 dias, quando as folhas começaram o processo de maturação, foi realizada a colheita, secagem e fermentação. Ao término da fermentação, avaliou-se a qualidade das folhas destinadas para a capa de cigarrilhas por três especialistas em tabaco, considerando aspectos visuais e sensoriais. Na análise sensorial, a variável analisada foi sabor, com os níveis bom, tolerável e ruim.

Análises estatísticas

Para o experimento *in vitro*, empregou-se modelos lineares generalizados (MGL), com distribuição binomial e função de ligação logit, e as inferências da análise de deviance (ANODEV) foram baseadas na estatística do Qui-quadrado. Para verificar as amplitudes de diferenças entre os tratamentos foram empregados testes de comparações múltiplas de médias com ajuste de Tukey, com correção de intervalo de confiança pelo método Sidak, pacotes

emmeans (LENTH et al., 2021) e multcompView (GRAVES et al., 2020). As análises foram executadas no software R versão 4.0.2 (R Core Team, 2020).

Para o comprimento do halo, utilizou-se os testes estatísticos não paramétricos como o teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. As análises foram executadas no software R versão 4.0.2 (R Core Team, 2020).

Os resultados dos experimentos de campo foram submetidos a análise de variância, e teste Scott- Knott a 5% de significância por meio do software R versão 4.0.2 (R Core Team, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antagônica in vitro

A concentração do produto comercial, de acordo com a análise realizada pelo laboratório Agronômica, estava abaixo do indicado no rótulo (1×10^{11} UFC/mL), apresentando $4,7 \times 10^5$ UFC/ mL. A redução da concentração de unidade formadora de colônia, pode ter sido um fator que também influenciou no teste de antagonismo, já que que em experimento *in vitro* YAN; KHAN (2021), notaram que com a utilização de metabólitos extraídos de *Trichoderma harzianum* na concentração de 180 mg/L, houve formação de halo de inibição de 20,2 mm. Em relação a interação dos agentes de controle biológico, sabe-se que espécies diferentes apresentam efeito antagônico distinto, sendo assim, a interação de mais de uma espécie na mesma formulação pode ter influenciado no controle *in vitro* de *R. solanacearum*.

Quanto à atividade antagônica *in vitro*, não houve formação de halo para os tratamentos com Biotrichomax®, independente das doses do produto (Tabela 1). Este resultado difere da pesquisa de REVATHI et al. (2017), que ao realizar experimento *in vitro* verificaram que o controle biológico com *Trichoderma harzianum* houve formação de halo de inibição com 14 mm, muito embora, *T. harzianum* foi menos eficaz quando comparado a outros agentes de biocontrole. Fatores como concentração do produto comercial, viabilidade do fungo e a

interação do agente de controle biológico com o patógeno, podem ter interferido neste resultado.

Em todos os tratamentos com Chevelle® houve formação de halos de inibição, sendo que a dose 2 mL/L foi a que formou halos com maior média do comprimento com $13,75 \text{ mm} \pm 3,877$, embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento com a menor dose do produto comercial (0,5 mL/L) (Tabela 1). O antagonismo evidenciado pode ser atribuído ao papel de antibiose de *Bacillus* spp. que ao entrar em contato com *R. solanacearum*, pode ter estimulado a produção de lipopeptídeos que garantiu o efeito supressor *in vitro* no patógeno. Em um estudo com dois isolados de *Bacillus* contra *R. solanacearum*, CAO et al. (2018) evidenciaram que ao utilizar *B. velezensis*, houve formação de lipopeptídeos como iturina e fengicina, que promoveram ação antagônica contra *R. solanacearum*.

Ao se avaliar os resultados da mistura de Chevelle® + Biotrichomax® nas diferentes concentrações, observou-se que a probabilidade de ocorrer a formação de halo é de 83,3% (Tabela 2) quando tratada com Chevelle® 1,5 mL/L + Biotrichomax® 1,5 mL/L, sendo o tratamento que apresentou maior comprimento do halo com $16,125 \text{ mm} \pm 2,906$ (Tabela 1), muito embora não tenha diferido estatisticamente dos tratamentos com Chevelle® 2,0 mL/L ($13,75 \text{ mm} \pm 3,877$), Chevelle® 1,0 mL/L + Biotrichomax® 1,0 mL/L, ($12,917 \text{ mm} \pm 3,06$); Chevelle® 2,0 mL/L + Biotrichomax® 2,0 mL/L ($12,208 \text{ mm} \pm 3,076$). Como os tratamentos com Chevelle® puro não diferiram significativamente dos tratamentos com a mistura de Chevelle® e Biotrichomax®, e os tratamentos com o uso isolado de Biotrichomax® não formaram halos, comprova-se que a adição do Biotrichomax® não apresentou efeito sobre *R. solanacearum*. Diferente do teste antagônico feito por ZHOU et al. (2021), que observaram redução do crescimento de *R. solanacearum* quando associaram *T. virens* e *B. velezensis*. Os autores notaram que a combinação dos agentes de controle biológico resultou em maior atividade antimicrobiana contra o patógeno quando comparado ao uso individual, o que

atribuem ao aumento de atividades enzimáticas que atuam nas respostas defensivas ao patógeno.

Incidência de R. solanacearum em campo

Nos ensaios à campo, o resultado do experimento 1 (Tabela 3) demonstrou que não houve diferença estatística quanto à incidência de *R. solanacearum* nos diferentes tratamentos com controle biológico (p-valor de 0,08), assim como no experimento 2 (p-valor de 0,25). O percentual de incidência média no experimento 1 foi 89,53% (Tabela 3), enquanto que nos experimentos 2 e 3 foram 82,62% e 69,73%, respectivamente (Tabela 4). Estes resultados diferem do estudo conduzido por AHMED et al. (2022), que ao realizar experimento *in vivo* com tabaco, notaram que o tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* cepa WS-10 apresentou efeito contra *R. solanacearum*, reduzindo a incidência da doença. TAHIR et al. (2017) em pesquisa com a cultura do tabaco para controle de *R. solanacearum*, verificaram que *B. amyloliquefaciens*, apresentou melhor resultado, pois essa bactéria antagonista libera compostos orgânicos voláteis que além de atuarem inibindo o patógeno, promovem resistência sistêmica através de estímulos de tolerância. Similarmente, GUO et al. (2021) evidenciaram que metabólitos produzidos por *T. harzianum* apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo*, sendo que *in vivo* houve redução da severidade da doença.

É complexo compreender as causas de não ter ocorrido o controle em campo, e uma série de fatores podem estar associados, como a tecnologia de aplicação, condições de solo, viabilidade do produto, potencial de inóculo do patógeno no solo, interação entre os produtos de biocontrole e patógeno, ou a interação entre todos eles.

O método de aplicação pode não ter sido o mais adequado, sendo que neste experimento, a aplicação foi via *drench*, com o produto localizado mais superficialmente. O tempo e o número de aplicações, podem ter impactado também nos resultados, pois sabe-se que

quanto antes for aplicado o agente de controle biológico melhor é o desempenho contra patógenos de solo (FIGUEIRÊDO, 2005; MILANESI, 2012). As características do solo assim como o manejo adotado influenciam nas populações de microrganismos, favorecendo ou inibindo o crescimento. A seleção das cepas comerciais também pode ter impactado nestes resultados, tendo em vista que existem diversos isolados de uma mesma espécie, que apesar de serem morfológicamente parecidos, são distintos fisiologicamente e apresentam mecanismos de ação diferentes.

O percentual de incidência média no experimento 2, apresentou diferença estatística na parcela com calcário (p-valor de 0,03), apresentando menor incidência média de *R. solanacearum* com 69,73% (Tabela 4). Na Figura 2 nota-se que apesar dos tratamentos de controle biológico não apresentarem diferença estatística, apresentaram médias de incidência menor nas parcelas com calcário. A redução da incidência da doença no experimento 2, nas parcelas que houve a aplicação de calcário, pode ter sido em função do aumento do pH do solo, que permite a melhor absorção de nutrientes pelas plantas, redução de estresse e resistência a patógenos, assim como aumento da população de microrganismos antagonistas. LI et al. (2017) em experimento com tabaco com solos coletados durante quatro anos em condições ácidas, observaram que a doença se desenvolveu rapidamente em solos com pH entre 4,5 a 5,5, no qual genes de virulência foram favorecidos, assim como o crescimento de bactérias antagonistas como *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* é inibido.

Análise de qualidade das folhas de Tabaco

A classificação das folhas quanto à qualidade foi avaliada sensorialmente por três especialistas em tabaco (Tabela 5). Nota-se que os tratamentos com aplicação em pré-plantio com Biotrichomax® (T1) e Chevelle® (T4) foram os únicos que não interferiram no parâmetro

sabor. As folhas receberam a mesma avaliação do tratamento controle (bom), entretanto ainda resultaram em uma pequena diferença na parte sensorial da folha.

CONCLUSÃO

Dentre os produtos comerciais testados *in vitro* Chevelle® apresentou antagonismo à *R. solanacearum* nas dosagens 0,5 mL/L, 1,0 mL/L, 1,5 mL/L e 2,0 mL/L.

Em campo não foi observado efeito dos produtos biológicos, aplicados de forma isolada ou conjunta, na redução da incidência de *R. solanacearum*.

Em geral, o emprego da calagem resultou na redução da incidência média da doença nos tratamentos.

No que se refere a qualidade do produto cujo parâmetro analisado foi o sabor, os tratamentos com aplicação pré-plantio com Biotrichomax® (T1) e Chevelle® (T4) foram os únicos que não apresentaram alteração no sabor.

REFERÊNCIAS

AHMED, W.; ZHOU, G.; YANG, J.; MUNIR, S.; AHMED, A.; LIU, Q.; ZHAO, Z.; JI, G. *Bacillus amyloliquefaciens* WS-10 as a potential plant growth-promoter and biocontrol agent for bacterial wilt disease of flue-cured tobacco. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2022. Available from: <<https://ejbpc.springeropen.com/counter/pdf/10.1186/s41938-022-00527-5.pdf>>. Accessed: Fev. 20, 2023. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00527-5>.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016, 516p.

AXEL, C.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; GUO, J.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology, Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 96, n. 1, p. 37-48, 2012. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4282-y>>. Accessed: Jan. 25, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4282-y>.

CAO, Y.; PI, H.; CHANDRANGSU, P.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHOU, H.; CAI, Y. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1038/s41598-018-22782-z.pdf>. Accessed: Jan. 25, 2023. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>.

DE SOUZA SANTOS, E.; DEPONTI, C. M. A produção de tabaco no Brasil: um estudo com base na teoria da localização e do crescimento regional de Douglass North. **COLÓQUIO-Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 18, n. 1, p. 153-167, 2021. Available from: <<http://seer.faccat.br/index.php/coloquio/article/view/1896>>. Accessed: Jan. 25, 2023. Doi: <https://doi.org/10.26767/1896>.

GUO, Y.; FAN, Z.; YI, X.; ZHANG, Y.; KHAN, R.A.A.; ZHOU, Z. Sustainable Management of Soil- Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* *In Vitro* and *In vivo* through Fungal Metabolites of different *Trichoderma* spp. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1491, 2021. Available from: <<https://www.mdpi.com/2071-1050/13/3/1491>>. Accessed: Jan. 26, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/su13031491>.

HILSINGER, R. O território do tabaco no Sul do Rio Grande do Sul diante da convenção quadro para o controle de tabaco. 223f. **Tese** (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

KARIUKI, C. K.; MUTITU, E. W.; MUIRU, W. M. Effect of *Bacillus* and *Trichoderma* species in the management of the bacterial wilt of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in the field.

Egyptian Journal of Biological Pest Control, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2020. Available from: <<https://ejbpc.springeropen.com/counter/pdf/10.1186/s41938-020-00310-4.pdf>>.

Accessed: Jan. 26, 2023. Doi: 10.1186/s41938-020-00310-4.

KAWAGUCHI, A.; KONDO, K.; INOUE, K. Biological control of apple crown gall by nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain VAR03-1. **Journal of General Plant Pathology**, v. 78, n. 4, p. 287-293, 2012. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-012-03884>. Accessed: Jan. 26, 2023.

KONAPPA, N.; KRISHNAMURTHY, S.; SIDDAIAH, C. N.; RAMACHANDRAPPA, N. S.; CHOWDAPPA, S. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2018. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s41938-018-0069-5>>. Accessed: Jan. 26, 2023. Doi: <https://link.springer.com/article/10.1186/s41938-018-0069-5>.

LI, S.; LIU, Y.; WANG, J.; YANG, L.; ZHANG, S.; XU, C.; DING, W. Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in South China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 703, 2017. Available from: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00703/full>>. Accessed: Dez. 01, 2022. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00703>.

LOWE-POWER, T. M.; KHOKHANI, D.; ALLEN, C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 929-942, 2018. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S09668442X18301379>>. Accessed: Nov. 5, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.002>.

MA, L.; ZHANG, H. Y.; ZHOU, X. K.; YANG, C. G.; ZHENG, S. C.; DUO, J. L.; MO, M. H. Biological control tobacco bacterial wilt and black shank and root colonization by bio-organic fertilizer containing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NXHG29. **Applied Soil Ecology**, v. 129, p. 136-144, 2018. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139317306820>>. Accessed: Jul. 05, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.011>.

MILANESI, P. M. **Aspectos biológicos da interação *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

O'BRIEN, P.A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293-304, 2017. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-017-0481-4>>. Accessed: Jan. 27, 2023. doi: 10.1007/s13313-017-0481-4.

REVATHI, R. M.; NARAYANASWAMY, H.; PATIL, B.; NAIK, S. N.; SHINDHE, M. *In vitro* evaluation of botanicals, bio agents and anti-bacterial chemicals against *Ralstonia solanacearum*. **International Journal Chemical Studies**, v. 5, n. 6, p. 1894-1898, 2017. Available from: <<https://www.ijcmas.com/7-6-2018/H.%20Nagaraja,%20et%20al.pdf>>. Accessed: Mar. 01, 2023. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.012>.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2a. Ed. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária. 2005. 417p.

TAHIR, H. A. S.; GU, Q., WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. *Bacillus volatiles* adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

Available from: <<https://www.nature.com/articles/srep40481>>. Accessed: Nov. 5, 2022. doi: 10.1038/srep40481.

YAN, L.; KHAN, R.A.A. Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, *Trichoderma harzianum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2021. Available from: <<https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-020-00351-9>>. Accessed: Mar. 01, 2023. doi: 10.1186/s41938-020-00351-9.

ZHOU, Y; YANG, L.; WANG, J.; GUO, L.; HUANG, J. Synergistic Effect between *Trichoderma virens* and *Bacillus velezensis* on the Control of Tomato Bacterial Wilt Disease. **Horticulturae**, v. 7, n. 11, p. 439, 2021. Available from: <<https://www.mdpi.com/2311-7524/7/11/439>>. Accessd. Ago. 6, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110439>.

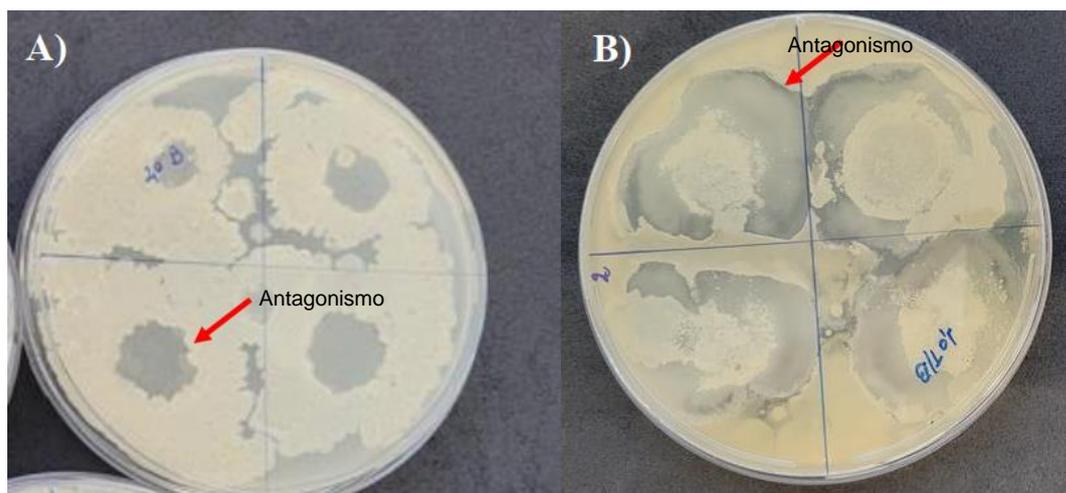


Figura 1 – Antagonismo *in vitro* pelo método de difusão de dupla camada contra *Ralstonia solanacearum*. (A) Chevelle® na concentração de 2 mL/L, (B) mistura dos produtos comerciais com Chevelle® + Biotrichomax® na dose de 1,5 mL/L.

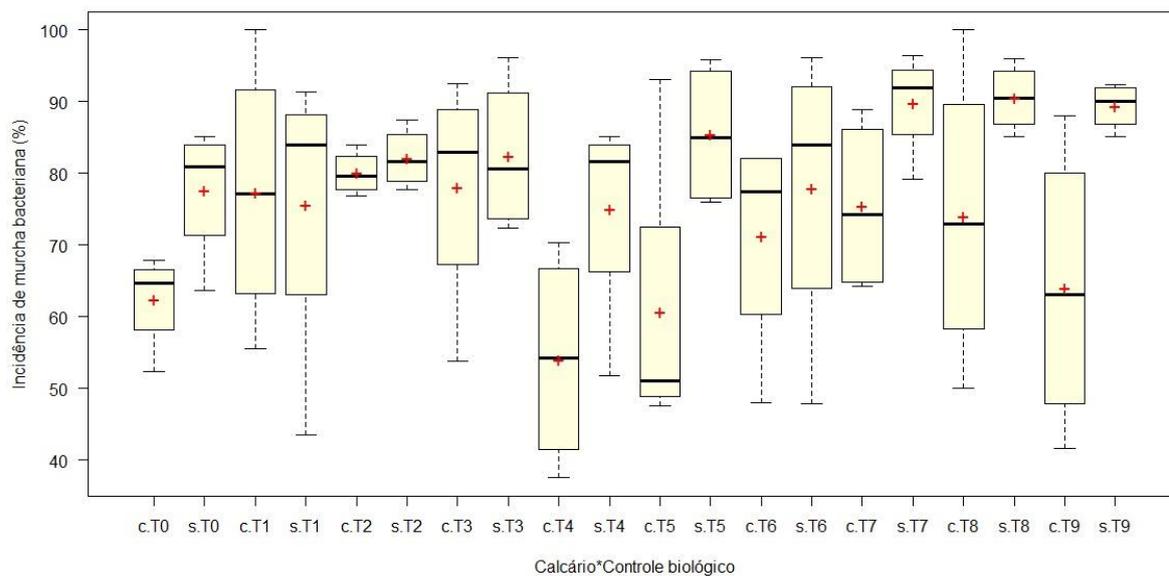


Figura 2 – Boxplot da incidência média de *R. solanacearum* em plantas cultivadas com e sem calcário e com aplicação de controle biológico no experimento 2. C (calcário); S (sem calcário).

Tabela 1: Média do comprimento (mm) do halo de inibição.

Tratamentos	Média ± erro padrão
Testemunha	0
Biotrichomax® 0,5 mL/L	0
Biotrichomax® 1,0 mL/L	0
Biotrichomax® 1,5 mL/L	0
Biotrichomax® 2,0 mL/L	0
Chevelle® 0,5 mL/L	8,583 ± 2,464 abc
Chevelle® 1,0 mL/L	1,875 ± 1,599 cd
Chevelle® 1,5 mL/L	6,208 ± 2,819 bcd
Chevelle® 2,0 mL/L	13,75 ± 3,877 a
Chevelle® 0,5 mL/L + Biotrichomax® 0,5mL/L	1,542 ± 1,086 d
Chevelle® 1,0 mL/L + Biotrichomax® 1,0 mL/L	12,917± 3,06 ab
Chevelle® s 1,5 mL/L + Biotrichomax® 1,5 mL/L	16,125 ± 2,906 a
Chevelle® 2,0 mL/L + Biotrichomax® 2,0 mL/L	12,208 ± 3,076 ab

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon, (nível significância=0.05).

Tabela 2: Probabilidade de formação de halo em relação aos tratamentos empregados.

Tratamentos	Probabilidade (%) de formação de halo
Testemunha	0
Biotrichomax® 0,5 mL/L	0
Biotrichomax® 1,0 mL/L	0
Biotrichomax® 1,5 mL/L	0
Biotrichomax® 2,0 mL/L	0
Chevelle® 0,5 mL/L	58.33 AB
Chevelle® 1,0 mL/L	8.33 C
Chevelle® 1,5 mL/L	33.33 ABC
Chevelle® 2,0 mL/L	58.33 AB
Chevelle® 0,5 mL/L + Biotrichomax® 0,5 mL/L	16.67 BC
Chevelle® 1,0 mL/L + Biotrichomax® 1,0 mL/L	66.67 AB
Chevelle® 1,5 mL/L + Biotrichomax® 1,5 mL/L	83.33 A
Chevelle® 2,0 mL/L + Biotrichomax® 2,0 mL/L	66.67 AB

Probabilidades seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ajustado pelo método de Sidak (nível significância=0.05).

Tabela 3: Incidência de *R. solanacearum* no experimento de campo 1 (período 22/11/2021 a 11/02/2022) com a dosagem de 1g/L água.

Controle biológico	Incidência da doença <i>R. solanacearum</i> (%)
T0 (testemunha)	90,7 a
T1	93,47a
T2	91,62a
T3	93,54a
T4	89,69a
T5	86,55a
T6	93,45a
T7	89,01a
T8	84,72a
T9	82,51a

Probabilidades seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Scott- Knott a 5% de significância.

Tabela 4: Incidência de *R. solanacearum* no experimento de campo 2, em plantas cultivadas sem e com calcário e com aplicação de controle biológico.

Tratamentos	Incidência de <i>R. solanacearum</i> %	
	Sem calcário	Com calcário
T0 (testemunha)	77,65 a	62,41 a
T1	75,64 a	77,43 a
T2	82,15 a	80,07 a
T3	82,48 a	78,10 a
T4	75,07 a	54,07 a
T5	85,42 a	60,68 a
T6	77,99 a	71,25 a
T7	89,89 a	75,43 a
T8	90,56 a	73,99 a
T9	89,41 a	63,96 a
Médias	82,62 a	69,73 b
CV 1 (%)		20,06
CV 2 (%)		18,95

Probabilidades seguidas por letras distintas nas linhas e nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, (nível significância=0.05)

Tabela 5: Teste de qualidade do tabaco dos experimentos de campo

Tratamentos	Sabor*
T0 (testemunha)	Bom
T1	Bom
T2	Tolerável
T3	Tolerável
T4	Bom
T5	Ruim
T6	Ruim
T7	Ruim
T8	Ruim
T9	Ruim

*Avaliação do sabor por teste de fumada, considerando os parâmetros, bom, tolerável e ruim dos dois experimentos de campo.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o produto comercial Chevelle®, à base de *Bacillus amyloliquefaciens*, demonstrou potencial inibitório contra *Ralstonia solanacearum* em condições de laboratório. A dose mais eficaz foi de 2 mL/L, resultando na formação de um halo de inibição ao redor das culturas bacterianas. O produto comercial Biotrichomax®, não apresentou efeito inibitório contra *R. solanacearum* nas concentrações testadas.

Em campo não foi observado efeito dos produtos biológicos, aplicados de forma isolada ou conjunta, na redução da incidência de *R. solanacearum*.

O emprego da calagem levou a redução da incidência média da doença, indicando que a calagem pode ser uma estratégia complementar promissora para reduzir a incidência de *R. solanacearum* na cultura do tabaco no Recôncavo baiano. No entanto, mais estudos são necessários para explorar outras opções de controle biológico e determinar a melhor abordagem para o manejo dessa doença.

REFERÊNCIAS

- ACHARI, G.A.; RAMESH, R. Colonization of eggplant by endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum*, the bacterial wilt pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 89, p. 585-593, 2019.
- AHMED, W.; DAI, Z.; ZHANG, J.; LI, S.; AHMED, A.; MUNIR, S.; ZHAO, Z. Plant-Microbe Interaction: Mining the Impact of Native *Bacillus amyloliquefaciens* WS-10 on Tobacco Bacterial Wilt Disease and Rhizosphere Microbial Communities. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e01471-22, 2022.
- AHMED, W.; YANG, J.; TAN, Y.; MUNIR, S.; LIU, Q.; ZHANG, J.; ZHAO, Z. *Ralstonia solanacearum*, a deadly pathogen: Revisiting the bacterial wilt biocontrol practices in tobacco and other Solanaceae. **Rhizosphere**, p. 100479, 2022.
- AHMED, W.; ZHOU, G.; YANG, J.; MUNIR, S.; AHMED, A.; LIU, Q.; ZHAO, Z.; JI, G. *Bacillus amyloliquefaciens* WS-10 as a potential plant growth-promoter and biocontrol agent for bacterial wilt disease of flue-cured tobacco. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2022.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016, 516p.
- Associação dos fumicultores do Brasil- AFUBRA**. Disponível em: <<https://afubra.com.br/fumicultura-brasil.html>>. Acessado em: 05 nov. 2020.
- AXEL, C.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; GUO, J.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 37-48, 2012.
- AXEL, C.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; GUO, J.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 37-48, 2012.
- BOSSOLANI, J.W.; CRUSCIOL, C.A.C.; MERLOTI, L.F.; MORETTI, L.G.; COSTA, N.R.; TSAI, S.M.; KARAMAE, E.E. Long-term lime and gypsum amendment increase nitrogen fixation and decrease nitrification and denitrification gene abundances in the rhizosphere and soil in a tropical no-till intercropping system. **Geoderma**, v. 375, p. 114476, 2020.
- BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **The nature and properties of soils**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2008, 980p.
- CAI, L.; CHEN, J.; LIU, Z.; WANG, H.; YANG, H.; DING, W. Magnesium oxide nanoparticles: effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 790, 2018.

- CAI, Q.; ZHOU, G.; AHMED, W.; CAO, Y.; ZHAO, M.; LI, Z.; ZHAO, Z. Study on the relationship between bacterial wilt and rhizospheric microbial diversity of flue-cured tobacco cultivars. **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 265-276, 2021.
- CAO, Y.; PI, H.; CHANDRANGSU, P.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHOU, H.; CAI, Y. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.
- CARMONA-HERNANDEZ, S.; REYES-PÉREZ, J.J.; CHIQUITO-CONTRERAS, R.G.; RINCON-ENRIQUEZ, G.; CERDAN-CABRERA, C.R.; HERNANDEZ-MONTIEL, L.G. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019.
- CHAGAS, L. F. B.; DE CASTRO, H. G.; COLONIA, B. S. O.; DE CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. D. O.; CHAGAS, A. F. J. Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 437-445, 2016.
- CHEN, J.; LI, S.; LUO, J.; WANG, R.; DING, W. Enhancement of the antibacterial activity of silver nanoparticles against phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* by stabilization. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.
- CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological research**, v. 164, n. 5, p. 493-513, 2009.
- CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. **Frontier in microbiology**, v. 6, p. 780, 2015.
- DE SOUZA SANTOS, E.; DEPONTI, C. M. A produção de tabaco no Brasil: um estudo com base na teoria da localização e do crescimento regional de Douglass North. **COLÓQUIO-Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 18, n. 1, p. 153-167, 2021.
- FERREIRA, T. C.; BETTIOL, W. Biocontrole de patógenos de solo e promoção de crescimento vegetal promovidos por *Bacillus* spp. em milho. **Journal of Biology and Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p. 337-356, 2019.
- GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 67-89, 2012.
- GHAFFARI, M.R.; GHABOOLI, M.; KHATABI, B.; HAJIREZAEI, M.R.; SCHWEIZER, P.; SALEKDEH, G.H. Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. **Plant molecular biology**, v. 90, p. 699-717, 2016.
- GUO, Y.; FAN, Z.; YI, X.; ZHANG, Y.; KHAN, R.A.A.; ZHOU, Z. Sustainable Management of Soil- Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* *in vitro* and *in vivo*

through Fungal Metabolites of different *Trichoderma* spp. **Sustainability**, v.13, n.3, p. 1491, 2021.

GURMESSA, B. Soil acidity challenges and the significance of limin and organic amendments in tropical agricultural lands with reference to Ethiopia. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, n.1, p. 77-79, 2021.

HANNAN, M. A.; HASAN, M. M.; ISMAIL, H. Impact of dual inoculations with *Rhizobium* and *Trichoderma* on root rot disease and plant growth parameters of grasspea under field conditions. **Persian Gulf Crop Protection**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2013.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD_ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

HE, K.; YANG, S. Y.; LI, H.; WANG, H.; LI, Z. L. Effects of calcium carbonate on the survival of *Ralstonia solanacearum* in soil and control of tobacco bacterial wilt. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, n. 4, p. 665-675, 2014.

HILSINGER, R. **O território do tabaco no Sul do Rio Grande do Sul diante da convenção quadro para o controle de tabaco**. 223f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

HOLLAND, J.E.; BENNETT, A.E.; NEWTON, A.C.; WHITE, P.J.; MCKENZIE, B.M.; GEORGE, T.S.; HAYES, R.C. Liming impacts on soils, crops and biodiversity in the UK: A review. **Science of the Total Environment**, v. 610, p. 316-332, 2018

HU, Y.; LI, C.; YANG, X.; FENG, J.; WANG, L. CHEN, S.; YANG, Y. Integrated biological control of tobacco bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) and its effect on rhizosphere microbial community. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 9, n. 3, p. 124-142, 2021.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#resultado>. Acessado em: 02 nov. 2020.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acessado em: 15 mar. 2023

JIANG, G.; WEI, Z.; XU, J.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; SHE, X.; LIAO, B. Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1549, 2017.

JIBAT, M.; GETU, A. Evaluation of Besun 200 SC (Zinc Thiazole 20%) Against Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in Southwestern Ethiopia. **International Journal of Research in Agriculture and Forestry**, v. 7, n. 7, p. 13-16, 2020.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 787-795, 2010.

KARIUKI, C. K.; MUTITU, E. W.; MUIRU, W. M. Effect of *Bacillus* and *Trichoderma* species in the management of the bacterial wilt of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in the field. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2020.

KIST, B. B. **Anuário brasileiro do tabaco 2016**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2016. 128 p.

KIST, B.B.; DE CARVALHO, C.; FARDIN, P.G.; BELING, R.R. **Anuário brasileiro do tabaco**. Gazeta, 2020. 132 p.

KONAPPA, N.; KRISHNAMURTHY, S.; ARAKERE, U.C.; CHOWDAPPA, S.; RAMACHANDRAPPA, N.S. Efficacy of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria and *Trichoderma* strains in eliciting resistance against bacterial wilt in a tomato. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 2020.

KONAPPA, N.; KRISHNAMURTHY, S.; SIDDAIAH, C. N.; RAMACHANDRAPPA, N. S.; CHOWDAPPA, S. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2018.

KOSHILA RAVI, R.; ANUSUYA, S.; BALACHANDAR, M.; MUTHUKUMAR, T. Microbial interactions in soil formation and nutrient cycling. **Mycorrhizosphere and pedogenesis**, p. 363-382, 2019.

KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753-763, 2008.

KUMAR, S. *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. **International Journal of Agriculture Science and Medical veterinary**, v. 1, n. 3, p. 106-121, 2013.

LI, S.; LIU, Y.; WANG, J.; YANG, L.; ZHANG, S.; XU, C.; DING, W. Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in South China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 703, 2017.

LIU, Y.; WU, D.; LIU, Q.; ZHANG, S.; TANG, Y.; JIANG, G.; DING, W. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is structured by elevation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, p. 541-551, 2017.

LOWE-POWER, T. M.; KHOKHANI, D.; ALLEN, C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 929-942, 2018.

MA, L.; ZHANG, H. Y.; ZHOU, X. K.; YANG, C. G.; ZHENG, S. C.; DUO, J. L.; MO, M. H. Biological control tobacco bacterial wilt and black shank and root colonization by bio-organic fertilizer containing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NXHG29. **Applied Soil Ecology**, v. 129, p. 136-144, 2018.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 296-300, 2008.

MENDES, L. **Anuário brasileiro do tabaco 2015**. Santa Cruz do Sul: Gazeta. 2015. 128p.

MENG, F. *Ralstonia solanacearum* species complex and bacterial wilt disease. **J. Bacteriol. Parasitol.**, v. 4, n. 2, p.1-4, 2013.

MIHOVILOVICH, E.; LOPES, C.; GUTARRA, L.; LINQVIST-KREUZE, H.; ALEY, P. PRIOU, S.; BONIERBALE, M. Protocol for assessing bacterial wilt resistance in greenhouse and field conditions. International co-operators' guide. Lima (Peru). **International Potato Center**. 2017. 35p

MILANESI, P. M. **Aspectos biológicos da interação *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto**. 131 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. 2012.

MUKHERJEE, P. K.; HURLEY, J. F.; TAYLOR, J. T.; PUCKHABER, L.; LEHNER, S.; DRUZHININA, I.; KENERLEY, C. M. Ferricrocin, the intracellular siderophore of *Trichoderma virens*, is involved in growth, conidiation, gliotoxin biosynthesis and induction of systemic resistance in maize. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 2, p. 606-611, 2018.

NARDI, J. B. **Análise da cadeia produtiva do tabaco da Bahia**. Salvador: Arcádia, 2013. 240p.

NASCIMENTO, D. D. **Promoção de crescimento e controle de nematoides da soja por isolados de *Bacillus* spp.** 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2019.

NION, Y.A; TOYOTA, K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments**, p. ME14144, 2015.

O'BRIEN, P.A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293-304, 2017.

OFOE, R.; THOMAS, R.H.; ASIEDU, S.K.; WANG-PRUSKI, G.; FOFANA, B.; ABBEY, L. Aluminum in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

RAMESH, R.; PHADKE, G.S. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Crop Protection**, v. 37, p. 35-41, 2012.

REVATHI, R. M.; NARAYANASWAMY, H.; PATIL, B.; NAIK, S. N.; SHINDHE, M. *In vitro* evaluation of botanicals, bio agents and anti-bacterial chemicals against *Ralstonia solanacearum*. **International Journal Chemical Studies**, v. 5, n. 6, p. 1894-1898, 2017.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; SATOS, M.S.; TALAMINI, V.; FERREIRA, J.M.S.; SANTOS, F.J. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-5, 2012.

SANTOS, C. E. **Anuário brasileiro do tabaco 2017**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2017, 128 p.

SHEN, G.; ZHANG, S.; LIU, X.; JIANG, Q.; DING, W. Soil acidification amendments change the rhizosphere bacterial community of tobacco in a bacterial wilt affected field. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 22, p. 9781-9791, 2018.

SINDITABACO. **Origem do Tabaco**. 2019. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/origem-do-tabaco/>. Acessado em: 02 nov. 2020.

SINGH, A.; SHUKLA, N.; KABADWAL, B.C.; TEWARU, A.K.; KUMAR, J. Review on plant-Trichoderma-pathogen interaction. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 2382-2397, 2018.

SOARES DE FIGUEIRÊDO, G. **Controle biológico de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. e *Ulocladium atrum* e patogenicidade ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

SOOD, M.; KAPOOR, D.; KUMAR, V.; SHETEIWY, M.S.; RAMAKRISHNAN, M.; LANDI, M.; SHARMA, A. Trichoderma: the “secrets” of a multitalented biocontrol agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.

TAHIR, H. A. S.; GU, Q., WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. *Bacillus volatiles* adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

TAHIR, H. A. S.; GU, Q., WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. *Bacillus volatiles* adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

THOR, K. Calcium - nutrient and messenger. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 440, 2019.

WAN, W.; TAN, J.; WANG, Y.; QUIN, Y.; HE, H.; WU, H.; HE, D. Responses of the rhizosphere bacterial community in acidic crop soil to pH: Changes in diversity, composition, interaction, and function. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134418, 2020.

WANG, H. C.; GUO, H.; Cai, L.; CAI, L. T.; GUO, Y. S.; DING, W. Effect of temperature on phenotype characterization of *Ralstonia solanacearum* from tobacco. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 42, n. 2, p. 164-181, 2020.

XUE, H.; LOZANO-DURÁN, R.; MACHO, A.P. Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. **Plants**, v. 9, p. 516, 2020.

YAN, L.; KHAN, R.A.A. Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, *Trichoderma harzianum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2021.

YANG, L.; LIU, S.Q.; LIANG, Y.; LIU, A.; YANG, Z. Population dynamics of main tobacco pests in the field and management suggestions. **International Journal of Pest Management**, v. 66, n. 1, p. 40-47, 2019.

YU, S. L.; WANG, C. T.; YANG, Q. L.; ZHANG, D. X.; ZHANG, X. Y.; CAO, Y. L. Peanut Genetics and Breeding in China. **Shanghai Science and Technology Press**, 2011.

ZHANG, J. C.; CHEN, G. Y.; LI, X. Z.; HU, M.; WANG, B. Y.; RUAN, B. H.; YANG, Y. B. Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. **Natural Product Research**, v. 31, n. 23, p. 2745-2752, 2017.

ZHAO, X.Q.; SHEN, R.F. Aluminum–nitrogen interactions in the soil–plant system. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 807, 2018.

ZHOU, Y.; YANG, L.; WANG, J.; GUO, L.; HUANG, J. Synergistic effect between *Trichoderma virens* and *Bacillus velezensis* on the control of tomato bacterial wilt disease. **Horticulturae**, v. 7, n. 11, p. 439, 2021.

ZHOU, Z.; WANG, C.; LUO, Y. Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.