

ROBERTO LANNA FILHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE PROCARIOTOS RESIDENTES DE
FILOPLANO DO TOMATEIRO COM POTENCIAL PARA O
CONTROLE DE DOENÇAS DA CULTURA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2008

ROBERTO LANNA FILHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE PROCARIOTOS RESIDENTES DE
FILOPLANO DO TOMATEIRO COM POTENCIAL PARA O
CONTROLE DE DOENÇAS DA CULTURA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2008.

Prof. José Rogério Oliveira
(Co-orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

A Deus por estar presente nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais Roberto Lanna e Giovanina Martino Lanna, pela educação e contribuição para a condução dos meus estudos.

À minha avó Maria da Conceição Martino (in memoriam) pelo carinho e dedicação a minha educação.

A tia Maria de Lourdes Martino pelo amor maternal durante minha vida.

Ao meu irmão Giovani Blasi Martino Lanna, pela amizade e companheirismo.

À minha noiva Aline Costa e Silva, pelo amor, dedicação e companheirismo perante as dificuldades.

Ao meu filho Vinícius Ferreira Lanna, pelo aprendizado, de ser pai

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o curso.

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro, pela oportunidade e orientação durante minha vida acadêmica, tendo a exímia função de educador.

Aos Professores José Rogério de Oliveira e Olinto Lipari Pereira, pelos conselhos e incentivos durante o desenvolvimento deste trabalho, onde sempre encontrei as portas abertas para obter ajuda.

Ao Dr. José Roberto Vieira Júnior, pela paciência no início da minha formação fitopatológica e solicitude com que me tratou.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos prestados, ajudando na minha formação.

Aos meus pais Roberto Lanna e Giovanina Martino Lanna, meu irmão Giovani Blasi Martino Lanna e, minha noiva Aline Costa e Silva que me ajudaram a superar as dificuldades.

Ao meu filho pelo amor incondicional e paciência.

A aqueles, que indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica que, se quer, tiveram condições de estudar.

A Deus, sem o qual nada disso teria sido possível.

BIOGRAFIA

Roberto Lanna Filho, filho de Roberto Lanna e Giovanina Martino Lanna, nascido em 31 de outubro de 1979 na cidade de Viçosa Minas Gerais. No ano de 2001 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, intitulado-se como Engenheiro Agrônomo em 2006.

No mesmo ano iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma instituição, na área de concentração em Bacteriologia de Plantas, sob orientação do Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, tendo sua tese submetida à banca examinadora em 19 de fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1.0. INTRODUÇÃO	1
2.0. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. OS PATÓGENOS	3
2.1.1. Pinta preta	3
2.1.2. Mancha bacteriana do tomateiro	4
2.2. RESIDENTES DE FILOPLANO COMO AGENTES DE BIOCONTROLE	6
3.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. ORIGEM, CULTIVO E PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	11
3.2. SELEÇÃO MASSAL.....	12
3.3. POTENCIALIDADE ANTAGONÍSTICA <i>IN VITRO</i>	13
3.4. SENSIBILIDADE DE DIFERENTES PATÓGENOS AO AMQ-CB	14
3.5. ESTUDO DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA CONSTITUTIVA DA <i>XANTHOMONAS</i> <i>CAMPESTRIS</i> PV. <i>VESICATORIA</i> A ANTIBIÓTICOS	15
3.5.1. Antibiograma <i>in vitro</i> com discos de antibióticos	15
3.5.2. Antibiograma quantitativo em placas com cavidades em dupla camada de gel, para determinação da concentração precisa dos antibióticos	16
3.5.3. Teste de repressividade	16
3.6. BIOENSAIO <i>IN VIVO</i> E COM FOLÍOLOS DESTACADOS PARA ESTUDO DAS TENDÊNCIAS POPULACIONAIS DO PATÓGENO BACTERIANO NA PRESENÇA DOS ANTAGONISTAS SELECIONADOS.....	17
3.7. BIOENSAIO <i>IN VIVO</i> E COM FOLÍOLOS DESTACADOS PARA DETERMINAR A CORRELAÇÃO ENTRE SEVERIDADE DA DOENÇA E INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DO PATÓGENO FÚNGICO (<i>ALTERNARIA SOLANI</i>) NA PRESENÇA DOS ANTAGONISTAS.	18
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. SELEÇÃO MASSAL.....	20
4.2. POTENCIALIDADE ANTAGONÍSTICA <i>IN VITRO</i>	27
4.3. SENSIBILIDADE DE DIFERENTES PATÓGENOS AO AMQ-CB	28
4.4. ANTIBIOGRAMA <i>IN VITRO</i> COM DISCOS DE ANTIBIÓTICOS	30
4.5. TESTE DE REPRESSIVIDADE.....	32
4.6. BIOENSAIO <i>IN VIVO</i> E COM FOLÍOLOS DESTACADOS PARA ESTUDO DAS TENDÊNCIAS POPULACIONAIS DO PATÓGENO BACTERIANO NA PRESENÇA DOS ANTAGONISTAS SELECIONADOS.....	37
4.7. BIOENSAIO <i>IN VIVO</i> E COM FOLÍOLOS DESTACADOS PARA DETERMINAR A CORRELAÇÃO ENTRE A SEVERIDADE DA DOENÇA E A INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DO PATÓGENO FÚNGICO (<i>ALTERNARIA SOLANI</i>) NA PRESENÇA DOS ANTAGONISTAS	39
5.0. CONCLUSÕES	42
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

LANNA FILHO, Roberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Isolamento e seleção de procariotos residentes de filoplano do tomateiro com potencial para o controle de doenças da cultura.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-orientadores: José Rogério Oliveira e Olinto Liparini Pereira.

O presente trabalho teve como objetivo isolar procariotos residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole contra o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. 300 isolados foram obtidos a partir de folhas sadias de tomateiros coletadas na micro-região de Viçosa-MG, as quais foram submetidas à extração das populações procarióticas epifíticas em solução de tampão fosfato (PBS) com emprego de ultra-som (60Hz, 20 min.) e semeadura de diluições em série em placas de Petri contendo meio 523. Em casa-de-vegetação, numa primeira etapa 79 isolados apresentaram capacidade de reduzir, em média, 82 % da severidade de doença. Desses, numa segunda etapa, 33 isolados apresentaram redução média da severidade de doença em 50 %. Os 33 isolados foram submetidos a testes de antibiose *in vitro*, em que foi avaliada a potencialidade em inibir o crescimento bacteriano e fúngico dos seguintes patógenos do tomateiro: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola*. Dos 33 isolados pré-selecionados verificou-se que o isolado RFK-24 foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Alternaria solani* e o RFS-183 em inibir o crescimento dos patógenos *Alternaria solani*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas corrugata*, mas ambos não inibiram o crescimento da *Corynespora cassiicola*. Os dois isolados foram selecionados para ensaios *in vivo* e em folíolos destacados, contra os patógenos desafiantes *Alternaria solani* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Para ambos foi observada a correlação entre a severidade de doença apresentada em casa-de-vegetação e os resultados em folíolos destacados, como a inibição da germinação de conídios do patógeno fúngico e a supressividade em meio semi-seletivo dos antagonistas sob o patógeno bacteriano. Os resultados obtidos com o método com folíolos destacados e sua correlação com os dados de biocontrole

experimental em casa-de-vegetação permitem deduzir que o uso de folíolos destacados pode ser utilizado como método para seleção massal.

ABSTRACT

LANNA FILHO, Roberto. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2008.
Isolation of resident prokaryote of the tomato plant phylloplane with potential for the control of diseases of the culture. Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-advisers: José Rogério Oliveira and Olinto Liparini Pereira.

This work aimed to select tomato prokaryotic phylloplane residents for biocontrol purposes, by using *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Alternaria solani* as challenging pathogens. Additionally, to perform a screening test using detached leaves. Consequently, leaves from healthy tomato plants were collected at Viçosa, MG and epiphytic prokaryote populations were extracted by shacking them in PBS (0,85% NaCl in 0,1M phosphate buffer saline, pH 7.0) following sonication (60Hz, 20 minutes) and serial dilution and plating in culture medium. Three hundred bacterial isolates were obtained and preserved in refrigerator, with periodical tube-tube transfer, in a refrigerator. The screening was performed in two selection cycles. In the first selection in greenhouse, with three replicates per isolate and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* as challenging pathogen, 79 isolates were able to reduce disease by 82%. In a second selection cycle, using 6 replicates per isolate, the 33 isolates were able to reduce severity by 50% in average. The 33 isolates had their antagonistic potential tested against the tomato fungal and bacterial pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Alternaria solani* and *Corynespora cassiicola* *in vitro* conditions. Out of the 33 isolates, the isolate RFK-24 inhibited growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Alternaria solani* while isolate RFS-183 was able to inhibit *Alternaria solani*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas corrugata*, but none of them inhibited *Corynespora cassiicola*. Being RFK-24 and RFS-183 the ones with a wider antagonistic potential out of the 33 previously selected, they were chosen for continuing the research with detached leaves and the challenging pathogens *Alternaria solani* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. There was a positive correlation between disease severity reduction in plants the greenhouse and in detached leaves, for both antagonists. For situations involving large number of

isolates to undergo mass screening, the approach with detached organs may replace the laborious and time consuming greenhouse screening.

1.0. Introdução

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), uma das olerícolas mais plantada em nosso país, é originário das Ilhas Galápagos e do Peru. Descoberto pelos espanhóis, estes o introduziram na Europa em 1544, onde inicialmente era tido como venenoso e cultivado apenas para fins ornamentais. Somente no século XIX o tomate passou a ser consumido e cultivado em grande escala, inicialmente na Itália, depois na França e na Espanha, sendo atualmente cultivado e consumido em todo o mundo (JONES *et al.*, 1991; FILGUEIRA, 2000).

Segundo CANÇADO JÚNIOR *et al.* (2003), o tomateiro é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata. Historicamente, o Brasil ocupa uma posição de destaque entre os maiores produtores mundiais, juntamente com a China, os Estados Unidos, a Turquia, a Índia, o Egito, a Itália, o Irã e a Espanha (FAO, 2006).

Em nosso país, a região Sudeste é a maior produtora de tomate para mesa e indústria, seguida pela região Centro-Oeste (CAMARGO FILHO & MAZZEI, 1997; SILVA & GIORDANO, 2000). Na região Sudeste, o Estado de São Paulo é líder na produção de tomate, seguido pelo Estado de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (IBGE, 2007). A produção brasileira de tomate, em 2006, foi estimada em cerca de 3,27 milhões de toneladas, em uma área de 56,8 mil hectares (FAO, 2006).

É notável a importância do cultivo desta hortaliça no Brasil, considerando-se os aspectos socioeconômicos envolvidos (LOPES & STRIPARI, 1998). Todavia, há fatores que limitam a produtividade desta cultura, destacando-se as doenças, que estão intimamente relacionadas com o nível de resistência genética da cultivar e o tipo de manejo empregado (KUROZAWA & PAVAN, 1997b). A cultura do tomateiro, hoje, é suscetível a mais de 200 doenças (JONES *et al.*, 1991; LOPES & SANTOS, 1994; AGRIOS, 1997) incitadas por diversos fitopatógenos, causando perdas acentuadas em pré e pós-colheita. O controle da maioria destas enfermidades é realizado com aplicações intensas de fungicidas, trazendo uma série de problemas, como: seleção de populações de microrganismos fitopatogênicos resistentes, diminuição ou eliminação de populações antagonistas, contaminação dos redutos aquíferos, permanência e persistência dos resíduos no solo, a contaminação dos frutos com resíduos, principalmente quando o período de carência não é respeitado.

Com a crescente busca pela qualidade de vida, a sociedade está mais exigente na aquisição de alimentos saudáveis, sem a utilização de agroquímicos. Com isso, vêm se buscando alternativas para o controle das fitomoléstias, sem o uso de defensivos agrícolas. Nesse contexto, o emprego de agentes de biocontrole torna-se uma realidade crescente (HANDELSMAN *et al.*, 1990; KHMEL *et al.*, 1998; ETEBARIAN *et al.*, 2005), difundindo-se como alternativa responsável e inteligente, com o uso de procariotos endofíticos, procariotos residentes de filoplano e, ou rizobactérias (MAY *et al.*, 1997; BARRETTI, 2001; SILVA, 2002; VIEIRA, 2002; ETEBARIAN *et al.*, 2005), na proposição de minorar o uso de agroquímicos e controlar as principais enfermidades desta cultura.

O presente trabalho teve como objetivos isolar 300 procariotos residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole contra o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, investigar quais meios de cultura, entre rico e mínimo que isolam com mais eficiência residentes de filoplano promissores para o biocontrole de doenças, e testar uma metodologia alternativa (folíolos destacados) para emprego na seleção de residentes de filoplano do tomateiro.

2.0. Revisão de Literatura

2.1. Os patógenos

Há múltiplas enfermidades que dificultam o cultivo do tomate em nosso país, com destaque para as manchas foliares que representam o principal problema nas lavouras de tomate. Dentre as principais manchas foliares a pinta preta (*Alternaria solani* (Ell. & Mart.)) e a mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DOIDGE) DEY (BRADBURY, 1986)) encontram-se entre as mais freqüentes doenças, causando perdas em torno de 78 % e 54 % na produção, respectivamente (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1999; TÖFOLI, 2004).

2.1.1. Pinta preta

A pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani*, caracteriza-se por ser bastante freqüente em lavouras de tomate (KUROZAWA & PAVAN, 1997a; VALE *et al.*, 2000), sendo encontrada em todas as regiões produtoras de tomate, variando de região para região o grau de incidência da doença. O fitopatógeno pode causar diferentes tipos de sintomas, sendo conhecido por mancha de alternaria, mofo-preto, cancro-da-haste e podridão basal. Segundo LOPES & SANTOS (1994), a pinta preta é considerada o maior problema nas lavouras de tomate, sendo responsável por grandes perdas, ocasionando até mesmo o abandono da área de plantio.

A doença é favorecida por temperaturas e umidades altas, sendo mais severa durante o verão chuvoso. Mas pode aparecer também no inverno, em períodos quentes acompanhados de umidade relativa elevada ou, muitas vezes, por excesso de irrigação. A pinta preta ocorre em folhas, caules e frutos e pode causar danos durante qualquer estágio fenológico da planta. Inicialmente, as manchas têm coloração marrom-escura tendendo a preta e aparecem nas folhas mais velhas, podendo apresentar halo amarelado em volta da lesão. As manchas aumentam rapidamente em tamanho e em número e, com o crescimento, são formados anéis concêntricos na parte central (MIZUBUTTI & BROMMONSCHENKEL, 1996). A ocorrência típica de halos concêntricos nas lesões causadas por *Alternaria solani* está relacionada à variações diurnas e noturnas de temperatura, umidade e radiação solar, que favorecem ou dificultam o desenvolvimento do fungo que, conseqüentemente, desenvolve-se na forma de setores.

A alta severidade da doença causa a desfolha da planta, expondo mais diretamente os frutos à ação dos raios solares (queimadura dos frutos) e reduzindo a capacidade fotossintética da planta, diminuindo assim a produção de frutos. No caule, as lesões são escuras e ligeiramente deprimidas no tecido. Com o crescimento, formam-se lesões alongadas e circulares, com anéis concêntricos evidentes. Nos frutos, se observam lesões de grande extensão, deprimidas, de coloração escura, aspecto aveludado e com anéis concêntricos. Os frutos que apresentam essas características caem facilmente no solo (LOPES & SANTOS, 1994).

A reprodução do patógeno ocorre pela formação de conídios multiseptados de cor escura. Os conídios são facilmente dispersos pelo vento e respingos de água. O fungo sobrevive em restos de cultura e em outros hospedeiros, como batata, berinjela e maria preta. Plantas nutricionalmente debilitadas estão mais predispostas à doença, principalmente no que se refere à deficiência de nitrogênio. O patógeno penetra diretamente pela cutícula ou por ferimentos e, após a penetração, os sintomas surgem dentro de três a cinco dias. O fungo também pode ser veiculado pela semente (LOPES & SANTOS, 1994).

As principais medidas de controle para a pinta preta são o plantio de sementes de boa qualidade e tratadas com fungicidas, rotação de culturas com eliminação das plantas voluntárias e plantas daninhas da família das solanáceas, eliminação dos restos culturais ou enterrio profundo dos mesmos logo após a colheita, evitar plantios sucessivos ou próximos a lavouras velhas que servem como fonte de inóculo, evitar áreas de baixadas que são úmidas ou sujeitas à formação de neblina, evitar irrigações frequentes e aplicar fungicidas preventivamente (LOPES & SANTOS, 1994).

2.1.2. Mancha bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana, causada por bactérias do gênero *Xantomonas*, é uma das doenças mais importantes do tomateiro, com ocorrência frequente em áreas irrigadas por aspersão tradicional ou por pivô-central, independente do estágio da cultura. As perdas devido a esta doença são resultantes da redução da produção em decorrência direta dos sintomas e dos custos dos produtos químicos utilizados em seu controle, notadamente fungicidas cúpricos (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1999). Além de aumentar os custos da produção, o controle químico é de baixa eficiência

(GOODE & SACCKER, 1980; MARINGON *et al.*, 1986; LOPES & QUEZADO-SOARES, 1999).

A baixa eficiência do controle químico e a pouca durabilidade dos cultivares resistentes à mancha bacteriana do tomateiro são atribuídas à alta variabilidade genética dos agentes causadores da doença (GOODE & SACCKER, 1980; BOUZAR *et al.*, 1999). Há sete décadas, esses agentes foram identificados como pertencentes a uma única espécie, denominada *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (ex DOIDGE, 1921) DYE (BRADBURY, 1993). No entanto, estudos recentes evidenciam que a mancha bacteriana é, na verdade, uma doença que pode ser encontrada por quatro espécies: *Xanthomonas euvesicatoria* (ex DOIDGE, 1921) sp. nov., emend (JONES *et al.*, 2004), *Xanthomonas vesicatoria* (ex DOIDGE, 1921) (JONES *et al.*, 2004), *Xanthomonas perforans* (JONES *et al.*, 2004) e *Xanthomonas gardneri* (SUTIC, 1957). sp. nov. (JONES *et al.*, 2004).

A mancha bacteriana pode ser observada em *Lycopersicon* spp. e *Capsicum* spp., mas pode ocorrer em outras espécies de hospedeiros como: *Datura stramonium*, *Hyoscyamus* spp., *Lycium* spp., *Nicotiana rustica*, *Nicandra physalodes*, *Physalis minima* e *Solanum* spp.. A bactéria sobrevive em tecidos infectados da parte aérea da planta e em restos culturais, podendo ser isolada de sementes de tomate e pimentão (GARDNER M. W. & KENDRICK., 1921; GARDNER M. W. & KENDRICK., 1923; BASHAN Y. *et al.*, 1982b). A incidência de doença em sementes de tomate podem chegar a 60 % e pimentão a 5 % (BASHAN Y. *et al.*, 1982b).

A doença pode se manifestar em qualquer estágio fenológico da cultura (GITAITIS *et al.*, 1992). Nas folhas, os primeiros sintomas aparecem na forma de pequenas áreas encharcadas de formato irregular, porém com bordos definidos, que se tornam deprimidas, passando de uma coloração amarelada ou verde-clara para um marrom-escuro até a necrose dos tecidos (GOODE & SACCKER, 1980; DUVAL, 2003).

Distintamente do que ocorre em pimentão, em tomateiro, a mancha bacteriana não leva à queda de folhas. Todavia, com o coalescimento das manchas necróticas foliares, verifica-se o secamento e destruição da folhagem a partir da parte baixa das plantas. Nos frutos as lesões iniciam-se na forma de pequenas áreas encharcadas a amarelas, que se tornam marrom-acinzentadas e de textura áspera (JONES, 1997); estas lesões tendem a ser deprimidas no centro e elevadas nas margens, variando entre dois a dez milímetros de diâmetro, podendo ser circundadas por um halo

amarelo a esbranquiçado (GOODE & SAC CER, 1980). A ocorrência da doença durante a floração causa quedas de flores, resultando em redução da produção (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997).

A mancha-bacteriana em tomateiro foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1959, em municípios do Estado de São Paulo (RODRIGUES NETO *et al.*, 1984). As perdas de produtividade em condições experimentais de campo foi observada em até 52 % (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1999).

Outros aspectos que mostram a importância da mancha-bacteriana para a cultura do tomateiro, tanto para consumo *in natura*, quanto para o processamento industrial, são: eficiência variável do controle químico, ausência de fontes de resistência adequada, rápida disseminação em condições favoráveis de altas temperaturas (24-30 °C) associadas à precipitação e, disseminação à longa distância por sementes contaminadas (GOODE & SAC CER, 1980; JONES, 1997). As sementes representam um meio para sobrevivência da bactéria por longos períodos (BASHAN *et al.*, 1982b).

2.2. Residentes de filoplano como agentes de biocontrole

O termo filosfera foi adotado por LAST (1955) em analogia à rizosfera, para descrever o ambiente que predomina na superfície da parte aérea dos vegetais. Mais tarde, KERLING (1958) usou o termo filosfera para descrever a zona próxima das folhas e, posteriormente LAST & DEIGHTON (1965) descreveram como filoplano a verdadeira superfície foliar. A população microbiana deste habitat é muito complexa em sua constituição, tendo-se enorme diversidade nos eventos e nas condições que equacionam sua dinâmica (BOWERS *et al.*, 1996; KINKLE, 1997). Apesar das condições muitas vezes adversas, o filoplano constitui um habitat comum para diversos microrganismos. Alguns destes podem ter ação contra fitopatógenos e apresentarem potencialidade como agentes de controle biológico (BAKER & COOK, 1974; BLAKEMAN, 1982; BEATTIE & LINDOW, 1999) ou serem indiferentes, apenas residindo no filoplano. As comunidades microbianas na superfície foliar são diversas e incluem diferentes populações de organismos como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas, e mais raramente, protozoários e nematóides (LINDOW & BRANDL, 2003). Os fungos filamentosos são considerados habitantes transitórios da superfície foliar, presentes predominantemente como esporos,

enquanto que as leveduras colonizam este habitat mais ativamente (ANDREWS & HARRIS, 2000). No entanto, são as bactérias que constituem a maior população desses microrganismos, sendo encontradas de forma mais abundante na filosfera, em média 10^6 a 10^7 células/cm² (até 10^8 células/grama de folha) (BEATTIE & LINDOW, 1995; WILSON *et al.*, 1999; ANDREWS & HARRIS, 2000).

As bactérias que têm como habitat a superfície foliar podem ser denominadas de filobactérias (BEATTIE & LINDOW, 1999), bactérias epífitas (LEBEN, 1965; HIRANO & UPPER, 1983; BEATTIE & LINDOW, 1999; LINDOW & LEVEAU, 2002; LINDOW & BRANDL, 2003) e bactérias residentes do filoplano (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2006). Nesta revisão será adotado o termo residente de filoplano.

Os residentes de filoplano têm sido definidos como populações capazes de sobreviver e multiplicar na superfície de plantas (LEBEN, 1965; HIRANO & UPPER, 1983). Desta maneira, desenvolvem estratégias de sobrevivência, encontrando-se em posições protegidas como na base de tricomas (LEBEN, 1969; BASHAN *et al.*, 1982a; MEW & VERA CRUZ, 1986; TIMMER *et al.*, 1987; MARIANO & McCARTER, 1993; APPEL *et al.*, 1999; LINDOW & BRANDL, 2003), em estômatos (MILES *et al.*, 1977; MEW & VERA CRUZ, 1986; TIMMER *et al.*, 1987; MARIANO & MCCARTER, 1993; PALUKAITIS & ROOSSINCK, 1996; APPEL *et al.*, 1999), hidatódios (MEW *et al.*, 1984) e especialmente ao longo das nervuras (MILES *et al.*, 1977; CAFATI & SAETTLER, 1980; WELLER & SAETTLER, 1980; LEBEN, 1988; IACOBELLIS *et al.*, 1993).

Notadamente, é importante destacar a disponibilidade de certos nutrientes para a manutenção das populações de residentes de filoplano. WILSON & LINDOW, (1994) relatam a presença de carbono como o principal determinante para a colonização das células bacterianas. O mesmo pode ser encontrado nas formas de glicose e frutose como fonte nutricional disponível, que são secretadas do interior das plantas (MERCIER & LINDOW, 2000; YUEH *et al.*, 2001). Deste modo, há formação de sítios específicos no filoplano (WELLER & SAETTLER, 1980; LEBEN, 1981; LEBEN, 1988), onde as populações residentes podem variar de acordo com a disponibilidade de nutrientes.

A disponibilidade de nutrientes, a umidade, a temperatura e o estágio fenológico da planta podem ser determinantes na colonização da superfície foliar por bactérias. Para determinar a distribuição de bactérias epífitas em folhas de oliva, ERCOLANI (1991) avaliou a flutuação dessas populações no tempo e em folhas com

idades distintas. O autor constatou que as diversidades das comunidades bacterianas foram mais baixas nas estações quentes e secas, enquanto em estações amenas e chuvosas as populações foram mais altas, coincidentemente, em folhas jovens as populações encontravam-se mais altas do que em folhas velhas. O mesmo foi relatado por THOMPSON *et al.* (1993), em estudos qualitativos e quantitativos de populações microbianas encontradas na filosfera de beterraba açucareira (*Beta vulgaris*). LINDOW & BRANDL (2003) constataram que o estágio fenológico da planta pode interferir na colonização bacteriana por limitar a difusão de nutrientes e inibir o molhamento da superfície foliar.

Em se tratando de bactérias, as mesmas possuem estratégias para sobreviverem em condições de estresse, como a tolerância e o escape. A primeira diz respeito à capacidade de tolerar as condições adversas do ambiente, como variações na umidade, variações extremas de temperatura, incidência de radiação ultravioleta (JACOBS & SUNDIN, 2001), enquanto a segunda trata da habilidade da bactéria em explorar sítios que apresentem condições estáveis, menos sujeitos a estresse ambiental (BEATTIE & LINDOW, 1995; BEATTIE & LINDOW, 1999).

No filoplano a capacidade de competição é maior quando há sobreposição das exigências nutricionais do antagonista e do fitopatógeno. Dessa forma, quanto maior o grau de igualdade entre os organismos maior será o grau de sobreposição (WILSON & LINDOW, 1994). Para tal, COOKSEY (1988) realizou um experimento no qual utilizou um mutante não patogênico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, onde obteve uma redução significativa da severidade da doença incitada pelo isolado patogênico, confirmando o maior efeito de sobreposição pelo grau de igualdade.

Os antagonistas residentes, além de exercerem o controle biológico clássico, como produção de substâncias antimicrobianas (VANNESTE *et al.*, 1992; MONTESINOS *et al.*, 1996), parasitismo direto, competição por nutrientes e por nichos ecológicos, há evidências que os mesmos podem exercer o controle biológico por indução de resistência (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2006). Estes autores demonstraram a capacidade de um residente de filoplano *Bacillus cereus*, autóctone do tomateiro, induzir resistência contra o patógeno desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, sendo observado o aumento significativo dos níveis de peroxidases em plantas expostas ao antagonista, assim como a sistemicidade da proteção, com isso, evidenciando o mecanismo de biocontrole por indução de resistência sistêmica

(IRS). BARGABUS *et al.* (2002) também atribuíram a um isolado de *Bacillus mycoides* a capacidade de induzir resistência sistêmica (IRS) contra o patógeno *Cercospora beticola*, marcado pelo aumento significativo de peroxidases nas plantas expostas ao antagonista, havendo um controle expressivo da mancha de cercospora.

A indução de resistência é uma sofisticada estratégia defensiva na percepção de ataques a patógenos, sendo traduzida em uma resposta apropriada e de forma adaptativa, capaz de reconhecer e responder aos mais diversos invasores. Isso é possível devido às rotas de sinalização, governadas por reguladores da defesa da planta, como ácido salicílico, jasminato e etileno.

A produção de substâncias antimicrobianas por antagonistas exercem efeitos danosos a outros organismos e isso pode ser observado em estudos com mutantes de *Erwinia herbicola* que produziram antibióticos eficientes no controle do patógeno *Erwinia amylovora* (VANNESTE *et al.*, 1992; KEARNS & MAHANTY, 1998; MONTESINOS *et al.*, 1996; ROMEIRO, 2005), bem como, estudos com o mesmo antagonista na produção de herbicolinas, capazes de inibir o crescimento de bactérias (ISHMARU *et al.*, 1988).

Como mecanismo de controle biológico, fungos e bactérias produzem substâncias de baixo peso molecular, denominadas de sideróforos, estes possuem a função de ligarem-se especificamente ao íon Fe^{+3} , sendo transportados para o interior da célula (NEILANDS, 1989). Os sideróforos são reconhecidos por proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática, podendo haver especificidade ou não (MEYER *et al.*, 1998), com isso, promovem o ingresso do complexo ferro-sideróforo na célula bacteriana (MEYER *et al.*, 1998). O ferro possui um papel importante para microrganismos, pois são co-fatores de enzimas, são componentes dos grupos heme das proteínas transportadoras de elétrons de mitocôndria e citocromo e na síntese de RNA (BRAUNBERGER *et al.*, 1997). Na ação contra fitopatógenos, os antagonistas produzem sideróforos em grande quantidade, indisponibilizando o Fe^{+3} para o patógeno desafiante (GLICK & BASHAN, 1997). De acordo com MEZIANE *et al.* (2005), sideróforos também podem atuar como indutores de resistência de plantas a ação de fitopatógenos.

A ação de residentes de filoplano no controle de doenças também foi detectada em plantas de cacaueteiro *in vitro*, onde foi observado a presença de compostos anti-fúngicos produzidos por residentes de filoplano para controle de *Crinipelis pernicioso* e o aumento de peroxidases pela planta em contato com os

actinomicetos *Streptomyces griseus* e *Streptomyces virginiae* (MACAGNAN, 2005). ROMEIRO *et al.* (2001d) realizaram experimento em campo usando um isolado de *Pseudomonas putida*, como agente de biocontrole de *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans* do tomateiro obtendo redução da severidade da doença.

A capacidade de uma bioformulação usando o antagonista *Pantoea agglomerans* no controle do patógeno *Erwinia amylovora* em pêra, conseguindo reduzir a severidade da doença (BORA *et al.*, 2004). No controle do cancro cítrico, PABITRA *et al.* (1996) isolaram uma cultura de *Bacillus subtilis* de filoplano de limoeiro capaz de inibir *in vitro* o crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* e de reduzir a incidência do cancro cítrico em 61,9 %, em experimentos de campo. KRISHNAMURTHY & GNANAMANICKAM (1998) estudaram o uso de *Pseudomonas fluorescens* no controle da brusone do arroz causada pelo patógeno *Pyricularia grisea* e verificaram que, em condições de viveiro, o isolado em estudo reduziu os sintomas em 68,5 % e em condições de campo proveu um controle da doença na ordem de 59,6 %.

3.0. Material e Métodos

3.1. Origem, cultivo e preservação dos microrganismos

Os residentes de filoplano candidatos a antagonistas foram isolados de folíolos de tomateiros, não expostos a agroquímicos. Os folíolos foram coletados em várias localidades da microrregião de Viçosa-MG, em épocas diferentes, com plantas de vários estádios fenológicos. A remoção dos mesmos foi realizada dividindo-se a planta em três partes distintas: terço superior (S), terço médio (M) e terço inferior (I), com o objetivo de encontrar a maior diversidade possível de populações residentes. As amostras de folíolos foram trazidas para o Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV e o isolamento das populações de procariontes residentes foi feito pela transferência de dois folíolos (HALFELD VIEIRA, 2002) para Erlenmeyer de 200 mL contendo 150 mL de solução tampão PBS (0,1M; pH=7,0) esterilizado com Tween 80 a 0,5 %, e submetidos a ultra-som (60 Hz/20 min.) (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004). Após este período, o extrato sofreu diluição seriada (fator 1:10³) e procedeu-se o semeio de 200 µL em duas placas de Petri (60x15 mm) distintas contendo o meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) e meio modificado de Simmons (SIMMONS, 1926), no qual o citrato de sódio (2 g/L) foi substituído por glicose (2 g/L), e foi retirado o azul de bromotimol (80 mg/L). O meio de 523 (KADO & HESKETT, 1970) corresponde ao meio rico e o meio de Simmons (SIMMONS, 1926) corresponde ao meio mínimo. As alíquotas foram espalhadas sobre a superfície dos meios de cultura com alça de Drigalsky e as placas mantidas em incubadora tipo B.O.D. por 24 h a 28 °C.

As culturas puras foram obtidas de placas correspondentes a diluições com crescimento de colônias individualizadas e diferentes em sua morfologia, sendo transferidas para tubos de cultura, contendo meio 523 (KADO & HESKETT, 1970). Os isolados de 1 a 150 foram obtidos em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) e identificados com as siglas RFK (Residente de Filoplano isolado em meio de Kado), e os isolados de 151 a 300 obtidos do meio modificado de Simmons (SIMMONS, 1926) e identificados com as siglas RFS (Residente de Filoplano isolado em meio de Simmons). A preservação foi por meio de transferências periódicas tubo-a-tubo (ROMEIRO, 2001c) e os tubos foram mantidos em geladeira.

Os microrganismos fitopatogênicos foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa-MG, Brasil. A fitobactéria (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) foi preservada em água destilada estéril (KLEMENT, 1990; HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2006) e em transferências tubo-a-tubo, seguindo-se armazenamento a 4 °C. O patógeno fúngico foi cultivado e preservado por meio de repicagens periódicas tubo-a-tubo (ROMEIRO, 2001c) em meio BDA (TUIITE, 1969), também mantido a 4 °C.

3.2. Seleção massal

Na primeira etapa de seleção massal para a determinação dos melhores antagonistas foram utilizadas plantas de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada', com 30 dias de idade, semeadas individualmente em copos plásticos de 500 mL com solo não esterilizado ou tratado com brometo de metila. As plantas foram separadas em grupos de três, onde para cada grupo realizou-se a dispensa de 60 mL (20 mL/planta) de suspensão de propágulos ($OD_{540} = 0,4$) de cada um dos candidatos a antagonistas. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, com irrigação apenas no solo. Após quatro dias, as plantas foram levadas para câmara de nevoeiro por 25 °C a 24 h, e a seguir pulverizou-se por atomização uma suspensão de células do patógeno desafiante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, na fase exponencial de crescimento ($OD_{540} = 0,4$) sobre as folhas das plantas e estas retornaram à câmara de nevoeiro, por mais 24 h a 25 °C (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004). Utilizou-se como controle positivo o produto comercial Fegatex, à base de cloretos de benzalcônio a 10 % na dose recomendada (2,5 mL/L) e como controle negativo, água. Os isolados mais promissores da primeira etapa de seleção massal foram selecionados para a segunda etapa, em que o procedimento foi repetido, separando no entanto, as plantas em grupos de seis. Para cada grupo realizou-se a dispensa de 120 mL (20mL/planta) de suspensão de cada um dos candidatos a antagonistas selecionados no primeiro ciclo, ajustada para 0,4 em absorvância de 540 nm.

Em ambas as etapas de seleção, as plantas foram transferidas da câmara de nevoeiro para a casa-de-vegetação onde, após 15 dias, quantificou-se a severidade de doença pela contagem da área foliar lesionada pelo uso do *software* Severity Pro. O experimento foi montado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) e a

análise estatística realizada pelo programa SAEG, versão 9.1, sendo as médias submetidas ao teste de comparação múltipla de Scott-Knott, a 5 % de significância.

No contexto deste trabalho, o produto comercial Fegatex será denominado de AMQ-CB, pois o mesmo pertence ao grupo químico amônio quaternário, tendo como ingrediente ativo cloretos de benzalcônio.

3.3. Potencialidade antagonística *in vitro*

Em placas de Petri (60x15 mm) foi utilizado o método de dupla camada (VIDAVER *et al.*, 1972), em que foram feitas camadas básicas (6 mL) contendo meio sólido 523 (KADO & HESKETT, 1970). Foram repicados três isolados/placa em pontos equidistantes. Os isolados promissores foram eleitos com base nos resultados na segunda etapa da seleção massal, seguindo-se incubação por 48 h a 28 °C. Após este período as colônias foram mortas por exposição à ultravioleta (UV) por uma hora e, assim, por mais uma hora a vapores de clorofórmio. Após a volatilização do clorofórmio, cada placa recebeu uma sobre-camada (6 mL) de meio semi-sólido fundente (45° C) contendo um dos patógenos. Foram feitas três repetições de cada candidato a antagonista para cada patógeno. O preparo da sobre-camada foi feita de acordo com o patógeno desafiante a ser testado.

Os patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, foram cultivados separadamente em Erlenmeyers de 50 mL contendo 30 mL de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, por 24 h a 28 °C. Após este período, foi retirada uma alíquota de 100 µL da cultura em fase exponencial de crescimento e dispensada em Erlenmeyer contendo 150 mL do mesmo meio semi-sólido fundente a 45 °C contendo 0,8 % de agar. Para *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola*, as culturas foram crescidas em meio BDA (TUIITE, 1969), por sete dias a 25 °C e o micélio e esporos formados foram transferidos para Erlenmeyer de 200 mL contendo 150 mL de BDA (TUIITE, 1969) semi-sólido fundente (45° C) contendo agar a 0,8 %.

Quando pertinente, registrou-se a presença de halo de inibição, sendo selecionados os candidatos antagonistas que inibiram maior número de patógeno teste.

3.4. Sensibilidade de diferentes patógenos ao AMQ-CB

O AMQ-CB foi testado nas concentrações 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 % e 0,2 %, contra os fitopatógenos *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola*. Para o teste quantitativo foi vertido meio fundente (45° C) de agar-água (2 %) em placas de Petri (150x30 mm), de modo a formar uma camada básica. Após solidificação, cada placa recebeu uma sobre-camada (6 mL) de meio semi-sólido fundente (45° C) contendo um dos patógenos. Foram feitas três repetições para cada patógeno. O preparo da sobre-camada foi feita de acordo com o patógeno desafiante a ser testado.

Os patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, foram cultivados separadamente em Erlenmeyers de 50 mL contendo 30 mL de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, por 24 h a 28 °C. Após este período, foi retirada uma alíquota de 100 µL da cultura em fase exponencial de crescimento e dispensada em Erlenmeyer contendo 150 mL do mesmo meio, semi-sólido fundente contendo 0,8 % de agar. As culturas de *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola* foram crescidas em meio BDA, por sete dias a 25 °C e o micélio e esporos formados foram transferidos para Erlenmeyer contendo 150 mL de BDA semi-sólido fundente (45° C) contendo agar a 0,8 %.

Com a solidificação da sobre-camada para os patógenos bacterianos e fúngicos, foram feitos orifícios de um centímetro de diâmetro com um furador de gel na sobre-camada, sem a perfuração da camada básica. As placas foram mantidas a 4 °C por 30 min. (ROMEIRO, 2001b), pois com a puncinagem ocorreu o extravasamento de água, que exsudou do meio para o interior da cavidade, enchendo-a parcialmente. A seguir, com a ponteira de uma pipeta acoplada a uma mangueira ao sistema gerador de vácuo, as cavidades foram esvaziadas por sucção, e posteriormente adicionado 30 µL das amostras de AMQ-CB nas concentrações anteriormente mencionadas.

3.5. Estudo da resistência múltipla constitutiva da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a antibióticos

3.5.1. Antibiograma *in vitro* com discos de antibióticos

A *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi cultivada em Erlenmeyer de capacidade para 50 mL, com 30 mL de meio líquido 523 (KADO & HESKETT, 1970) por 24 h a 28 °C. Após este período, foi retirada uma alíquota de 100 µL da cultura em fase exponencial de crescimento e dispensada em meio semi-sólido 523 (KADO & HESKETT, 1970) fundente a 45 °C, com agar a 0,8 % (ROMEIRO, 2001a). A mistura foi vertida em placa de Petri (60x15 mm), após solidificação, três discos de antibióticos por placa foram dispostos equidistantemente na superfície do meio.

O antibiograma foi realizado com 50 fármacos antimicrobianos, sendo testadas três repetições para cada substância. As placas foram mantidas em incubadora tipo B.O.D a 28 °C por 24 h. Após esse período foi avaliada a presença ou não de halos de inibição (ROMEIRO, 2001a). As substâncias testadas foram: Ácido nalidíxico (30 µg), Ácido oxolínico (30 µg), Ácido pipemídico (20 µg), Ácido clavulânico (30 µg), Amicacina (30 µg), Amoxicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Azitromicina (15 µg), Aztreonama (30 µg), Bacitracina (10 µg), Cefaclor (30 µg), Cefadroxil (30 µg), Cefalexina (30 µg), Cefalotina (30 µg), Cefazolina (30 µg), Cefepima (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefoxitina (30µg), Cefprozil (30µg), Ceftazidima (30µg), Cefuroxima (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Claritromicina (15µg), Clindamicina (2µg), Cloranfenicol (30µg), Doxiciclina (30µg), Estreptomina (10µg), Fosfomicina (50 µg), Gentamicina (10µg), Imipenem (10µg), Kanamicina (30µg), Levofloxacina (5 µg), Lincomicina (2µg), Lomefloxacina (10µg), Neomicina (30µg), Nitrofurantoína (300µg), Norfloxacina (10µg), Ofloxacina (5µg), Optoquina (1µg), Oxacilina (1µg), Penicilina (10µg), Rifampicina (5µg), Sulbactam (10µg), Sulfazotrim (25µg), Sulfonamida (300µg), Teicoplanina (30µg), Tetraciclina (30µg), Tobramicina (10µg), Trimetoprim (5µg) e Vancomicina (30µg).

Os fármacos antimicrobianos que não inibiram o crescimento do patógeno foram selecionados, para continuação do trabalho.

3.5.2. Antibiograma quantitativo em placas com cavidades em dupla camada de gel, para determinação da concentração precisa dos antibióticos

Os fármacos selecionados no ensaio qualitativo foram usados em placas com cavidades em dupla camada de gel, feitos na sobre-camada com auxílio de um furador de gel. Para tal, foi vertido meio fundente de agar-água (2 %) em placas de Petri, formando a camada básica. Cada placa recebeu uma sobre-camada de meio semi-sólido fundente. O patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, foi cultivado em Erlenmeyer contendo 30 mL de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, por 24 h a 28 °C. Após este período, uma alíquota de 100 µL foi retirada da cultura em fase exponencial de crescimento e dispensada em Erlenmeyer com 150 mL do mesmo meio semi-sólido fundente contendo agar a 0,8 %.

Com a solidificação do meio semi-sólido foram feitos orifícios de um centímetro de diâmetro na sobre-camada, sem a perfuração da camada básica. As placas foram mantidas a 4 °C por 30 min. (ROMEIRO, 2001b), pois com a puncinagem ocorreu o extravasamento de água, que exsudou do meio para o interior da cavidade, enchendo-a parcialmente. A seguir, com a ponteira de uma pipeta acoplada a uma mangueira ao sistema gerador de vácuo, as cavidades foram esvaziadas por sucção, sendo adicionado as amostras dos fármacos antimicrobianos. As amostras foram adicionadas separadamente às cavidades, nas concentrações de 2048 mg/L, 1024 mg/L, 512 mg/L, 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L, 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L e 1 mg/L. As placas foram mantidas em temperatura de 28 °C por 24 h, para o crescimento bacteriano.

Os fármacos selecionados foram aqueles que não apresentaram atividade inibitória contra o isolado de *X. c.* pv. *vesicatoria*, nas concentrações de 2048 mg/L a 1 mg/L.

3.5.3. Teste de repressividade

Os fármacos antimicrobianos selecionados (estreptomicina, cefalexina e cefadroxil) foram testados isoladamente, e em quatro combinações possíveis, a saber: estreptomicina + cefalexina, estreptomicina + cefadroxil, cefalexina + cefadroxil e estreptomicina + cefalexina + cefadroxil. Os antibióticos foram adicionados em frascos do tipo “side arm” em duas concentrações distintas (50 mg/L e 100 mg/L), contendo 150 mL de meio líquido 523 (KADO & HESKETT, 1970). Com isso, 100

μL de propágulos da fitobactéria na fase exponencial de crescimento foram adicionados nos mesmos frascos contendo mesmo meio.

De modo a verificar se a combinação dos antibióticos pode exercer efeito sinérgico deletério, o estudo da curva de crescimento foi realizada ao espectrofotômetro com densidade ótica de 540 nm, com leituras de duas em duas horas. Os antibióticos selecionados para a realização do meio semi-seletivo foram os que apresentaram menor inibição do crescimento da fitobactéria.

3.6. Bioensaio *in vivo* e com folíolos destacados para estudo das tendências populacionais do patógeno bacteriano na presença dos antagonistas selecionados

Os isolados que apresentaram antagonismo *in vitro* a mais de um patógeno foram selecionados para teste de uma metodologia alternativa de seleção. Os ensaios foram realizados em condições de casa-de-vegetação e laboratório. Plantas de tomate cultivar Santa Cruz 'Kada' com 30 dias de idade foram atomizadas com suspensão de células dos residentes de filoplano ($\text{OD}_{540} = 0,4$), tendo-se três repetições por tratamento. Após quatro dias, as plantas foram inoculadas com o patógeno desafiante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* via atomização ($\text{OD}_{540} = 0,4$). Para o controle positivo foi atomizado o AMQ-CB (2,5 g i.a. L^{-1}) e para o controle negativo água. Após 24 h, foram destacados do terço superior (S), terço médio (M) e terço inferior (I) de cada planta, quatro gramas de folíolos. Os mesmos foram transferidos para Erlenmeyer de 200 mL contendo 150 mL de solução tampão PBS (0,1M; $\text{pH}=7,0$) estéril com 0,5 % de Tween 80, e submetidos a ultra-som a 60 Hz por 20 min. (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004).

Após a obtenção do extrato foi realizado uma diluição seriada, com fator de diluição variando até $1:10^3$, sendo depositados 200 μL das amostras obtidas em cada diluição sob placas de Petri (60x15 mm) contendo meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) com os antibióticos selecionados. Com a alça de Drigalsky, a alíquota depositada foi espalhada sobre a superfície para a semeadura homogênea (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004), com posterior incubação das placas à 28 °C por 72 h. Após este período foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C) por grama de tecido foliar.

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por 15 dias e quando do aparecimento dos sintomas, o número de lesões por folíolo foi quantificado. A

análise estatística dos ensaios foi realizada por meio do programa SAEG, versão 9.1, num delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância. A análise de correlação linear dos ensaios foi realizada pela correlação de Pearson, por meio do programa Statistica®, versão 7.0.

3.7. Bioensaio *in vivo* e com folíolos destacados para determinar a correlação entre a severidade da doença e a inibição da germinação de conídios do patógeno fúngico (*Alternaria solani*) na presença dos antagonistas

Os isolados que apresentaram, *in vitro*, efeito direto a mais de um patógeno foram submetidos a ensaios em condições de casa-de-vegetação e laboratório. As plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz 'Kada' com 30 dias de idade foram separadas em grupos de três para cada tratamento. Os isolados testes foram dispensados por atomização ($OD_{540} = 0,4$) e os demais tratamentos com AMQ-CB (2,5 g i.a. L⁻¹), e água (controle negativo).

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e, após 4d, foi removido um folíolo do terço médio (M) de cada planta, e inoculou-se via atomização o patógeno desafiante *Alternaria solani* (1,0 x 10⁵ conídios/mL). Com isso, as plantas foram levadas para câmara de nevoeiro, onde permaneceram por 24 h a 25 °C. Paralelamente, os folíolos previamente removidos do terço médio (M) de cada tratamento foram transferidos para câmara úmida e em cada um deles foi depositada uma gota de 30 µL contendo suspensão de propágulos de *Alternaria solani* (1,0 x 10⁵ conídios.mL⁻¹).

Após 24 h foram removidos discos de folíolo com diâmetro de um centímetro da região em que a gota foi depositada. Os discos foram transferidos para placas de Petri (40x10 mm) contendo solução de lactofenol (20 g de fenol, 20 g de ácido láctico e 40 g de glicerol) e, após 24 h, imersos em lactofucsina (0,1 g de fucsina ácida em 100 mL de ácido láctico) e dispostos sobre lâmina de microscopia para avaliação da percentagem de conídios germinados. O número de conídios contados foram 100, dividindo-se a área do disco foliar em quadrantes e contando 25 conídios (germinados e não germinados) por quadrante.

Em casa-de-vegetação, após o aparecimento dos sintomas, a quantificação de severidade de doença foi feita pela contagem do número de lesões por folíolo.

A análise estatística foi realizada por meio do programa SAEG, versão 9.1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. A análise de correlação linear dos ensaios foi realizada pela correlação de Pearson, por meio do programa Statistica®, versão 7.0.

4.0. Resultados e Discussão

4.1. Seleção Massal

Os 300 isolados de procariotos residentes de filoplano testados na primeira etapa de seleção massal foram separados em quatro grupos de severidade de doença, de menor severidade (A) até a maior severidade (D). Dentre estes, 79 foram incluídos no grupo A, 209 no grupo B, 10 no grupo C e 2 no grupo D. Dos grupos somente o D não diferiu do controle que apresentou 39,3 % da severidade de doença. O tratamento com o isolado RFS-157 mostrou-se mais efetivo, com 3,2 % da severidade de doença quando comparado com o controle (39,3% de doença) (Tabela 1). Os isolados do grupo A (79) apresentaram efeitos promissores na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, apresentando em média 3,9 % da severidade de doença quando comparado com o controle (39,3 % de doença) (Tabela 2). Os 221 isolados restantes não foram eleitos por exibirem baixo desempenho no controle de doença.

Os 79 isolados mais promissores, submetidos à segunda etapa de seleção, em que 33 isolados se destacaram no controle da mancha bacteriana com média de 4,5 % da severidade de doença, não diferiu do tratamento com AMQ-CB que apresentou 3,9 % da severidade de doença, comparativamente com o controle (8,9 % de doença) (Tabela 3).

Em se tratando da obtenção dos isolados nos dois meios de cultura, tanto para a primeira etapa de seleção, quanto para a segunda etapa, 58 % dos isolados vieram do meio modificado de Simmons (SIMMONS, 1926) e 42 % do meio 523 (KADO & HESKETT, 1970).

Com os resultados apresentados, é possível afirmar que, embora a microbiota epifítica presente na superfície foliar seja de maioria bacteriana (BEATTIE & LINDOW, 1995; WILSON *et al.*, 1999; LINDOW & LEVEAU, 2002; LINDOW & BRANDL, 2003), somente uma pequena porção destas tem a capacidade de suprimir a ação de fitopatógenos, podendo ser utilizados como possíveis agentes de biocontrole. Isso pôde ser confirmado neste trabalho, pois dos 300 isolados residentes de filoplano, somente 33 isolados mostraram-se capazes de controlar o patógeno desafiante, isso corresponde a 11 % dos residentes testados.

Na segunda etapa de seleção massal, 19 % dos isolados estimularam o aparecimento de sintomas quando comparado com o controle (8,9 % de doença)

(Tabela 3). Dessa forma, há possibilidade de que alguns isolados tenham favorecido o aparecimento de sintomas conforme relatado por FERNANDO *et al.* (1994). Os autores ao dispensarem por atomização um isolado de *Pseudomonas* spp. aumentaram a eficiência de infecção de um isolado de *Colletotrichum coccodes*, em plantas de *Abutilon theophrasti*. LUZ (1985) credita a microrganismos saprófitas, que vivem na superfície do filoplano de plantas têm a capacidade de, sob certas condições, degradar a cera e a cutícula foliar abrindo portas de entrada para patógenos.

Com relação à obtenção dos isolados nos dois meios de cultura, o meio modificado de Simmons (SIMMONS, 1926) demonstrou uma percentagem maior de residentes de filoplano eleitos nas duas etapas de seleção. Os isolados que cresceram no meio mínimo podem ter apresentado uma maior capacidade adaptativa em adquirir nutrientes em condições adversas, demonstrando possuir mecanismos que facilitem o seu estabelecimento e a eficiência na aquisição de nutrientes. Comparativamente, é possível notar a capacidade adaptativa, por exemplo, de microrganismos que sintetizam sideróforos e têm a capacidade de adquirir íon Fe^{+3} mesmo em baixíssimas concentrações, fazendo deste mecanismo essencial para o estabelecimento em habitats inóspitos (GLICK & BASHAN, 1997).

O experimento conduzido em casa-de-vegetação apresentou variações de temperaturas de, 25-37 °C (setembro a março) e 15-25 °C (abril a agosto). Este fato, possivelmente proporcionou o aumento da severidade de doença na primeira etapa de seleção, pois o experimento foi conduzido nos meses mais quente do ano (setembro a março), proporcionando o aumento da efetividade da infecção pelo patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. O contrário foi observado para a segunda etapa de seleção, em que o experimento foi conduzido de abril a agosto, apresentando menor severidade de doença pelo patógeno. O favorecimento do surgimento de sintomas e aumento da severidade de doença também foi relatado por LOPES & QUEZADO-SOARES (1999), em tomates com temperaturas variando de 24-30 °C ocasionando perdas de até 52 % da cultura.

Tabela 1- Severidade da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em plantas de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada', previamente expostas aos diferentes tratamentos (residentes de filoplano, AMQ-CB, e controle). Os grupos A (79 isolados), B (209 isolados), C (10 isolados) e D (2 isolados).

Grupos	Tratamentos	% de doença*	Grupos	Tratamentos	% de doença*
A	RFS-157	1,0 a	B	RFS-289	8,3 b
A	RFS-225	1,1 a	B	RFK-13	8,3 b
A	RFS-231	1,2 a	B	RFS-238	8,3 b
A	RFK-16	1,2 a	B	RFK-127	8,4 b
A	RFK-105	1,4 a	B	RFK-101	8,6 b
A	RFS-195	1,4 a	B	RFK-21	8,6 b
A	RFS-171	1,6 a	B	RFK-110	8,6 b
A	RFK-47	2,0 a	B	RFS-274	8,6 b
A	RFS-263	2,1 a	B	RFS-284	8,7 b
A	RFK-48	2,2 a	B	RFS-181	8,7 b
A	RFS-167	2,3 a	B	RFS-191	8,7 b
A	RFK-23	2,4 a	B	RFK-58	8,8 b
A	RFK-102	2,4 a	B	RFS-180	8,8 b
A	RFS-194	2,5 a	B	RFS-168	8,9 b
A	RFS-226	2,5 a	B	RFS-169	8,9 b
A	RFK-128	2,6 a	B	RFS-233	8,9 b
A	RFK-133	2,6 a	B	RFK-99	9,0 b
A	RFS-160	2,9 a	B	RFK-115	9,0 b
A	RFS-224	3,0 a	B	RFS-223	9,0 b
A	RFK-144	3,1 a	B	RFS-286	9,0 b
A	RFK-38	3,2 a	B	RFS-256	9,0 b
A	RFS-228	3,2 a	B	RFK-79	9,1 b
A	AMQ-CB	3,2 a	B	RFS-198	9,1 b
A	RFK-44	3,3 a	B	RFS-156	9,2 b
A	RFS-277	3,3 a	B	RFS-273	9,2 b
A	RFS-204	3,4 a	B	RFS-294	9,2 b
A	RFK-24	3,5 a	B	RFK-120	9,2 b
A	RFS-269	3,5 a	B	RFK-15	9,3 b
A	RFS-222	3,6 a	B	RFS-272	9,3 b
A	RFK-18	3,6 a	B	RFS-276	9,3 b
A	RFS-174	3,7 a	B	RFS-188	9,4 b
A	RFS-178	3,8 a	B	RFS-175	9,5 b
A	RFS-210	3,8 a	B	RFS-232	9,5 b
A	RFS-211	3,8 a	B	RFK-131	9,6 b
A	RFS-214	3,8 a	B	RFS-251	9,7 b
A	RFS-279	3,8 a	B	RFK-97	9,9 b
A	RFK-103	3,9 a	B	RFS-154	10,0 b
A	RFS-248	3,9 a	B	RFK-70	10,1 b

Continua...

...Continuação

A	RFK-123	4,0 a	B	RFK-93	10,2 b
A	RFS-281	4,0 a	B	RFS-184	10,2 b
A	RFK-49	4,1 a	B	RFS-200	10,2 b
A	RFK-129	4,1 a	B	RFS-220	10,3 b
A	RFS-176	4,1 a	B	RFS-230	10,4 b
A	RFK-32	4,2 a	B	RFS-253	10,4 b
A	RFK-33	4,2 a	B	RFS-207	10,5 b
A	RFS-192	4,2 a	B	RFK-43	10,5 b
A	RFS-258	4,2 a	B	RFK-149	10,6 b
A	RFK-30	4,3 a	B	RFK-96	10,6 b
A	RFK-1	4,4 a	B	RFS-245	10,8 b
A	RFK-34	4,5 a	B	RFK-60	10,9 b
A	RFK-125	4,5 a	B	RFS-189	11,0 b
A	RFK-135	4,5 a	B	RFS-244	11,0 b
A	RFS-205	4,6 a	B	RFK-74	11,0 b
A	RFK-45	4,7 a	B	RFK-55	11,0 b
A	RFS-212	4,7 a	B	RFS-177	11,0 b
A	RFK-106	4,8 a	B	RFK-10	11,2 b
A	RFS-186	4,8 a	B	RFK-39	11,5 b
A	RFS-235	4,8 a	B	RFS-299	11,7 b
A	RFK-41	4,8 a	B	RFK-66	11,9 b
A	RFK-26	4,9 a	B	RFS-196	12,0 b
A	RFK-124	5,0 a	B	RFS-283	12,0 b
A	RFS-264	5,1 a	B	RFK-119	12,0 b
A	RFS-271	5,0 a	B	RFK-64	12,2 b
A	RFK-12	5,2 a	B	RFK-134	12,2 b
A	RFS-229	5,2 a	B	RFK-147	12,2 b
A	RFS-262	5,2 a	B	RFK-62	12,2 b
A	RFK-19	5,2 a	B	RFK-148	12,3 b
A	RFK-31	5,2 a	B	RFS-172	12,4 b
A	RFS-261	5,2 a	B	RFS-165	12,5 b
A	RFS-202	5,3 a	B	RFS-214	12,6 b
A	RFS-209	5,3 a	B	RFK-20	12,6 b
A	RFS-250	5,3 a	B	RFK-114	12,9 b
A	RFS-255	5,3 a	B	RFS-296	13,1 b
A	RFK-140	5,4 a	B	RFS-298	13,1 b
A	RFS-213	5,4 a	B	RFK-118	13,4 b
A	RFS-217	5,5 a	B	RFK-82	13,6 b
A	RFS-265	5,5 a	B	RFK-143	13,6 b
A	RFS-166	5,6 a	B	RFS-236	13,6 b
A	RFS-237	5,6 a	B	RFK-56	13,7 b
A	RFS-221	5,6 a	B	RFK-67	13,7 b
B	RFK-142	5,7 b	B	RFS-190	13,8 b
B	RFK-146	5,7 b	B	RFK-83	13,9 b
B	RFS-161	5,7 b	B	RFK-4	14,0 b
B	RFK-14	5,8 b	B	RFS-153	14,0 b
B	RFK-121	5,8 b	B	RFS-243	14,0 b
B	RFS-163	5,8 b	B	RFK-22	14,4 b
B	RFS-240	5,8 b	B	RFK-57	14,5 b
B	RFK-111	5,9 b	B	RFK-95	14,6 b

Continua...

...Continuação

B	RFK-130	5,9	B	RFS-300	14,8 b
B	RFS-179	5,9	B	RFK-90	14,8 b
B	RFS-249	5,9	B	RFK-81	14,9 b
B	RFK-3	6,0	B	RFK-63	15,2 b
B	RFS-152	6,0	B	RFK-37	15,2 b
B	RFS-270	6,0	B	RFS-164	15,2 b
B	RFK-42	6,1	B	RFK-78	15,3 b
B	RFS-183	6,1	B	RFS-275	15,3 b
B	RFS-267	6,1	B	RFK-52	15,4 b
B	RFS-280	6,1	B	RFS-199	15,4 b
B	RFK-28	6,2	B	RFS-193	15,6 b
B	RFS-234	6,3	B	RFK-112	15,7 b
B	RFS-282	6,5	B	RFS-252	15,8 b
B	RFK-107	6,5	B	RFK-61	16,0 b
B	RFK-29	6,5	B	RFS-151	16,2 b
B	RFS-197	6,5	B	RFS-206	16,2 b
B	RFK-6	6,6	B	RFK-72	16,3 b
B	RFK-9	6,6	B	RFK-54	16,4 b
B	RFK-137	6,6	B	RFS-288	16,5 b
B	RFS-254	6,6	B	RFS-173	16,5 b
B	RFK-11	6,6	B	RFK-76	16,6 b
B	RFK-27	6,7	B	RFS-215	16,6 b
B	RFK-5	6,7	B	RFS-293	16,8 b
B	RFK-117	6,8	B	RFK-86	17,0 b
B	RFK-40	6,8	B	RFK-77	17,2 b
B	RFS-287	6,9	B	RFK-85	17,2 b
B	RFK-8	6,9	B	RFK-59	17,5 b
B	RFK-17	6,9	B	RFS-218	17,5 b
B	RFS-159	7,0	B	RFK-71	17,8 b
B	RFS-247	7,0	B	RFS-292	18,0 b
B	RFS-241	7,0	B	RFS-227	18,2 b
B	RFK-109	7,0	B	RFK-89	18,2 b
B	RFS-170	7,1	B	RFK-73	18,3 b
B	RFS-185	7,1	B	RFS-259	18,4 b
B	RFS-260	7,1	B	RFK-91	18,6 b
B	RFS-201	7,1	B	RFK-80	18,8 b
B	RFS-158	7,1	B	RFK-100	18,8 b
B	RFK-139	7,2	B	RFS-242	18,8 b
B	RFS-219	7,2	B	RFK-65	18,9 b
B	RFK-35	7,3	B	RFS-285	18,9 b
B	RFS-182	7,4	B	RFK-7	19,3 b
B	RFK-113	7,4	B	RFK-25	19,4 b
B	RFK-50	7,5	B	RFK-84	19,5 b
B	RFS-297	7,5	B	RFS-291	19,5 b
B	RFS-162	7,5	B	RFK-2	19,5 b
B	RFS-239	7,6	B	RFK-92	19,7 b
B	RFS-268	7,6	B	RFK-104	19,8 b

Continua...

...Continuação

B	RFK-108	7,6 b	B	RFS-150	19,8 b
B	RFK-136	7,6 b	B	RFS-155	20,1 b
B	RFS-246	7,6 b	B	RFK-53	20,2 b
B	RFS-208	7,8 b	B	RFS-257	20,6 b
B	RFS-266	7,8 b	C	RFK-94	21,9 c
B	RFK-145	7,9 b	C	RFK-75	22,0 c
B	RFS-203	7,9 b	C	RFK-138	22,3 c
B	RFS-216	8,0 b	C	RFK-132	22,7 c
B	RFS-278	8,0 b	C	RFK-126	23,0 c
B	RFK-46	8,1 b	C	RFK-68	23,3 c
B	RFK-36	8,2 b	C	RFK-116	23,3 c
B	RFK-69	8,2 b	C	RFK-51	23,4 c
B	RFK-122	8,2 b	C	RFK-98	24,3 c
B	RFK-141	8,2 b	D	RFK-88	36,3 d
B	RFS-187	8,2 b	D	RFK-87	37,2 d
B	RFS-295	8,2 b	D	Controle	39,3 d

* Tratamentos seguidos de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Tabela 2- Severidade da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em plantas de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada' previamente pulverizadas com residentes de filoplano, AMQ-CB, e controle (água). Os resultados apresentados são relativos apenas aos antagonistas com desempenho satisfatório, comparativamente ao controle (água).

Tratamentos	% de Doença*	Tratamentos	% de Doença*	Tratamentos	% de Doença*
RFS-157	1,0 a	RFS-269	3,5 a	RFS-212	4,7 a
RFS-225	1,1 a	RFS-222	3,6 a	RFK-106	4,8 a
RFS-231	1,2 a	RFK-18	3,6 a	RFS-186	4,8 a
RFK-16	1,2 a	RFS-174	3,7 a	RFS-235	4,8 a
RFK-105	1,4 a	RFS-178	3,8 a	RFK-41	4,9 a
RFS-195	1,4 a	RFS-210	3,8 a	RFK-26	4,9 a
RFS-171	1,6 a	RFS-211	3,8 a	RFK-124	5,0 a
RFK-47	2,0 a	RFS-214	3,8 a	RFS-264	5,1 a
RFS-263	2,0 a	RFS-279	3,8 a	RFS-271	5,1 a
RFK-48	2,2 a	RFK-103	3,9 a	RFTK-12	5,2 a
RFS-167	2,3 a	RFS-248	3,9 a	RFTS-229	5,2 a
RFK-23	2,4 a	RFK-123	4,0 a	RFTS-262	5,2 a
RFK-102	2,4 a	RFS-281	4,0 a	RFT-K19	5,2 a
RFS-194	2,4 a	RFK-49	4,1 a	RFT-K31	5,2 a
RFS-226	2,5 a	RFK-129	4,1 a	RFT-S261	5,2 a
RFK-128	2,5 a	RFS-176	4,1 a	RFT-S202	5,3 a

Continua...

...Continuação

RFK-133	2,6 a	RFK-32	4,2 a	RFS-209	5,3 a
RFS-160	2,9 a	RFK-33	4,5 a	RFS-250	5,3 a
RFS-224	3,0 a	RFS-192	4,2 a	RFS-255	5,3 a
RFK-144	3,1 a	RFS-258	4,2 a	RFK-140	5,4 a
RFK-38	3,1 a	RFK-30	4,3 a	RFS-213	5,4 a
RFS-228	3,1 a	RFK-1	4,4 a	RFS-217	5,5 a
RFK-44	3,1 a	RFK-34	4,5 a	RFS-265	5,5 a
AMQ-CB	3,3 a	RFK-125	4,5 a	RFS-166	5,5 a
RFS-277	3,3 a	RFK-135	4,5 a	RFS-237	5,6 a
RFS-204	3,4 a	RFS-205	4,6 a	RFS-221	5,6 a
RFK-24	3,5 a	RFK-45	4,7 a	Controle	39,3 b

* Tratamentos seguidos de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Tabela 3- Severidade da mancha bacterianas causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em plantas de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada' previamente pulverizadas com residentes de filoplano, AMQ-CB, e controle (água).

Tratamentos	% de Doença*	Tratamentos	% de Doença*	Tratamentos	% de Doença*
RFS-250	0,8 a	RFK-12	6,3 a	RFS-161	8,5 b
RFK-125	1,5 a	RFK-42	6,3 a	RFS-277	8,6 b
RFS-171	1,6 a	RFS-231	6,3 a	RFS-157	8,6 b
RFS-176	2,4 a	RFK-105	6,4 a	RFK-106	8,8 b
RFK-49	2,7 a	RFK-3	6,4 a	RFK-33	8,9 b
RFK-24	2,8 a	RFS-262	6,5 a	RFK-101	8,9 b
RFK-103	2,9 a	RFK-14	6,7 a	Controle	8,9 b
RFS-269	2,9 a	RFS-226	7,2 b	RFK-32	9,1 b
RFK-48	3,1 a	RFK-31	7,2 b	RFS-263	9,1 b
AMQ-CB	3,9 a	RFS-209	7,3 b	RFS-267	9,1 b
RFS-217	3,2 a	RFS-264	7,4 b	RFS-232	9,3 b
RFS-204	3,3 a	RFS-178	7,4 b	RFK-144	10,1 b
RFK-28	3,5 a	RFK-19	7,4 b	RFK-30	10,9 c
RFS-271	3,5 a	RFK-25	7,5 b	RFS-224	11,4 c
RFS-183	4,1 a	RFS-222	7,5 b	RFK-44	11,5 c
RFS-179	4,2 a	RFS-237	7,6 b	RFS-223	11,6 c
RFS-166	4,4 a	RFK-16	7,6 b	RFK-124	12,1 c

Continua...

...Continuação

RFS-255	4,7 a	RFK-18	7,6 b	RFK-23	13,2 c
RFS-229	4,7 a	RFS-221	7,6 b	RFS-280	13,2 c
RFS-202	5,2 a	RFK-47	7,6 b	RFK-123	14,0 c
RFS-194	5,4 a	RFS-248	7,8 b	RFK-45	14,7 c
RFK-38	5,5 a	RFS-261	8,0 b	RFS-240	14,8 c
RFK-1	5,6 a	RFS-265	8,0 b	RFK-41	14,8 c
RFS-210	5,7 a	RFK-121	8,1 b	RFK-26	14,9 c
RFS-228	5,8 a	RFK-34	8,2 b	RFK-140	15,1 c
RFK-20	5,9 a	RFS-213	8,4 b	RFK-102	15,4 c
RFS-167	6,2 a	RFS-152	8,5 b	RFK-128	15,5 c

* Tratamentos seguidos de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.2. Potencialidade antagonística *in vitro*

Dos 33 isolados que apresentaram os melhores resultados contra o patógeno desafiante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, foram submetidos a testes de antibiose *in vitro*, contra os patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola* (Tabela 4), somente três apresentaram efeito direto *in vitro* contra um ou mais patógenos: RFS-176, RFS-183 e RFK-24. O primeiro apresentou efeito inibitório contra, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, o segundo contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas corrugata*, o último contra *Xanthomonas. campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Alternaria solani*. Os três isolados não apresentaram inibição ao crescimento de *Corynespora cassiicola*.

É possível que os residentes de filoplano sintetizem algum tipo de substância tóxica com efeito deletério sobre os fitopatógenos, ocasionando a inibição do seu crescimento. Os isolados RFS-183 e RFK-24, que apresentaram uma atividade antagonica mais ampla contra patógenos do tomateiro, foram selecionados para estudos em laboratório e em casa-de-vegetação (Figura 1).

Tabela 4- Sensibilidade dos patógenos aos antagonistas RFS-176, RFS-183 e RFK-24, com presença (+) ou ausência (-) de halos de inibição.

Patógenos	Residentes do Filoplano		
	RFT-24	RFT-183	RFT-176
	Halo Presença/Ausência	Halo Presença/Ausência	Halo Presença/Ausência
<i>A. solani</i>	+	+	-
<i>C. cassicola</i>	-	-	-
<i>C. m. subsp. michiganensi</i>	+	-	+
<i>P. s. pv. tomato</i>	-	+	-
<i>P. corrugata</i>	-	+	-
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	+	+	-

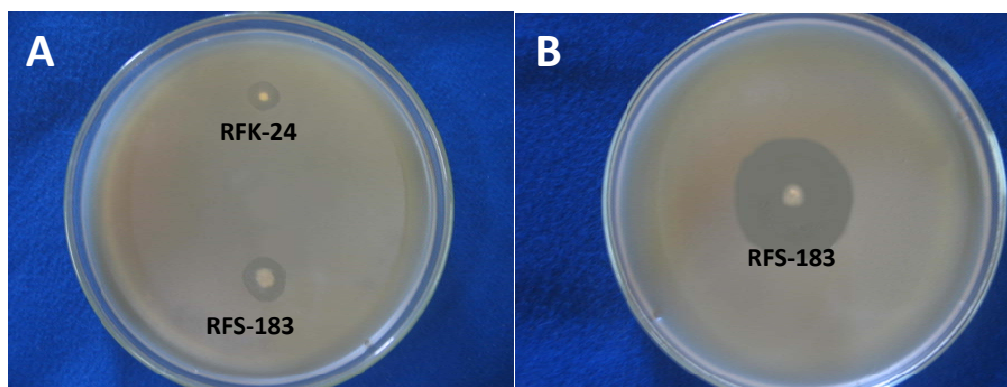


Figura 1- Teste de antibiose *in vitro*. A- halo de inibição dos antagonistas RFS-183 e RFK-24 repicados por ponto, contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; B- halo de inibição do antagonista RFS-183 contra *Pseudomonas corrugata*.

4.3. Sensibilidade de diferentes patógenos ao AMQ-CB

Compostos de amônio quaternário possuem ação bactericida, algicida, fungicida e viricida (LAWRENCE, 1970; NAKAJIM & SHIGEMATSU, 1983; GUZZO *et al.*, 1999; McBAIN *et al.*, 2004; OOSTERHOF *et al.*, 2006). Desta maneira, a inibição do crescimento dos microrganismos pode ter ocorrido pela ação do princípio ativo cloretos de benzalcônio (composto de amônio quaternário). Alguns tratamentos exibiram ainda um halo amarelado ao redor dos orifícios, provavelmente devido a componentes da formulação como, surfactantes LAWRENCE (1970), adicionados para potencializar o efeito do produto em contato com o tecido foliar e que difundiram no gel (Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

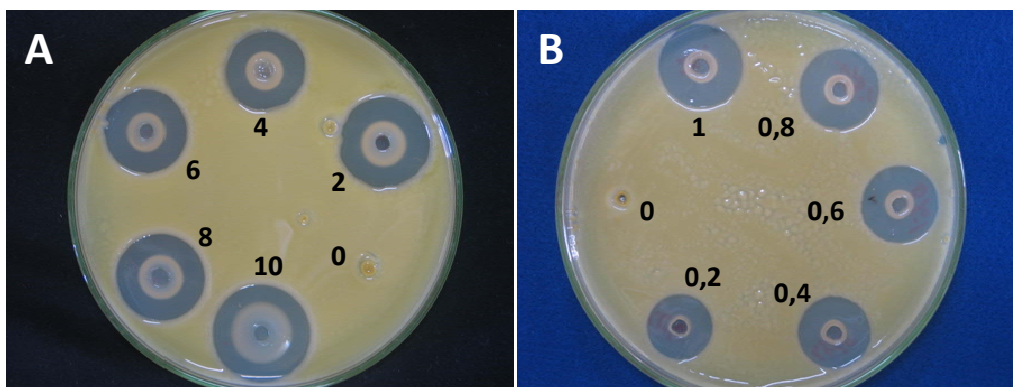


Figura 2- Halos de inibição *in vitro* do AMQ-CB. A- halos de inibição nas concentrações de 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % e ausência de halo; B- halos de inibição nas concentrações de 1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 % e ausência de halo. O patógeno desafiante testado foi *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

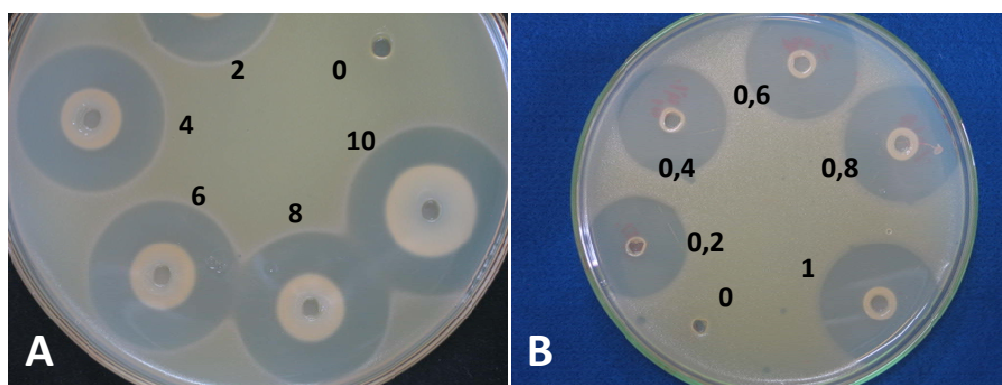


Figura 3- Halos de inibição *in vitro* do AMQ-CB. A- halos de inibição nas concentrações de 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % e ausência de halo; B- halos de inibição nas concentrações de 1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 % e ausência de halo. O patógeno desafiante testado foi *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

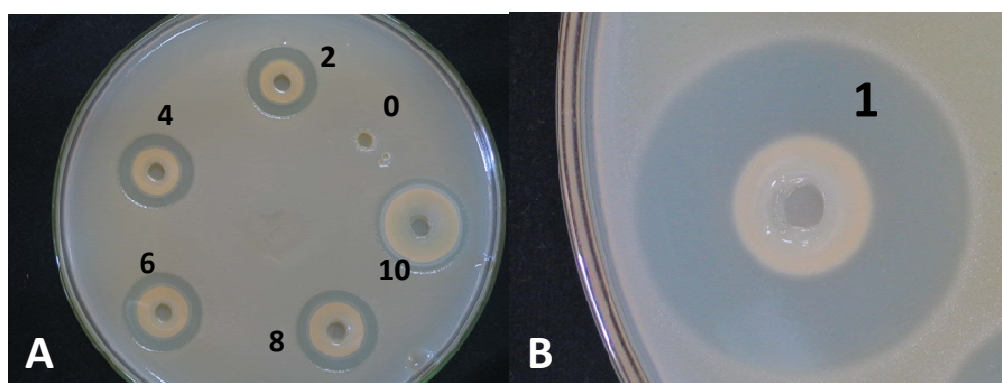


Figura 4- Halos de inibição *in vitro* do AMQ-CB. A- halos de inibição nas concentrações de 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % e ausência de halo; B- representação do halo de inibição a 1 %. O patógeno desafiante testado foi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

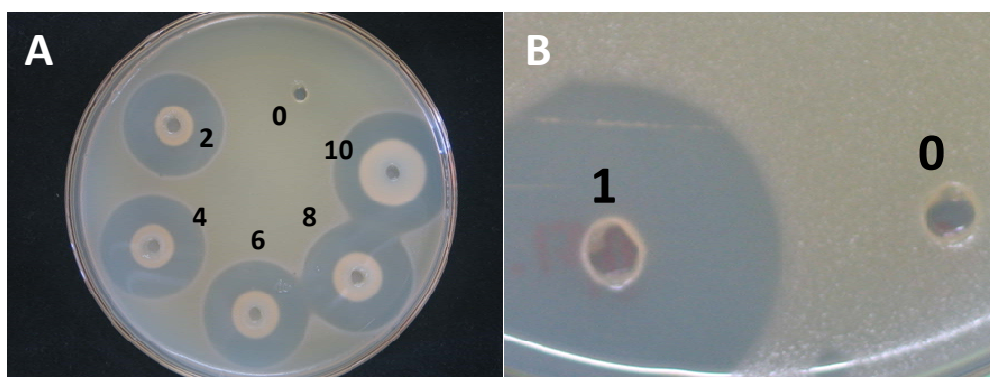


Figura 5- Halos de inibição *in vitro* do AMQ-CB. A- halos de inibição nas concentrações de 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % e ausência de halo; B- representação do halo de inibição a 1 % comparativamente a ausência de halo. O patógeno desafiante testado foi *Pseudomonas corrugata*.

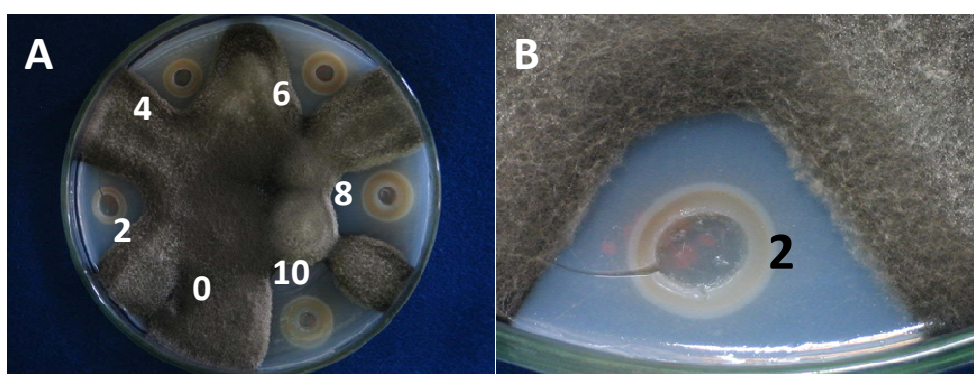


Figura 6- Halos de inibição *in vitro* do AMQ-CB. A- halos de inibição nas concentrações de 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 % e ausência de halo; B- representação do halo de inibição a 2 %. O patógeno desafiante testado foi *Alternaria solani*.

4.4. Antibiograma *in vitro* com discos de antibióticos

Dos 50 antibióticos testados, somente estreptomicina, cefalexina e cefadroxil não inibiram o crescimento do patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *in vitro* (Tabela 5 e Figura 7).

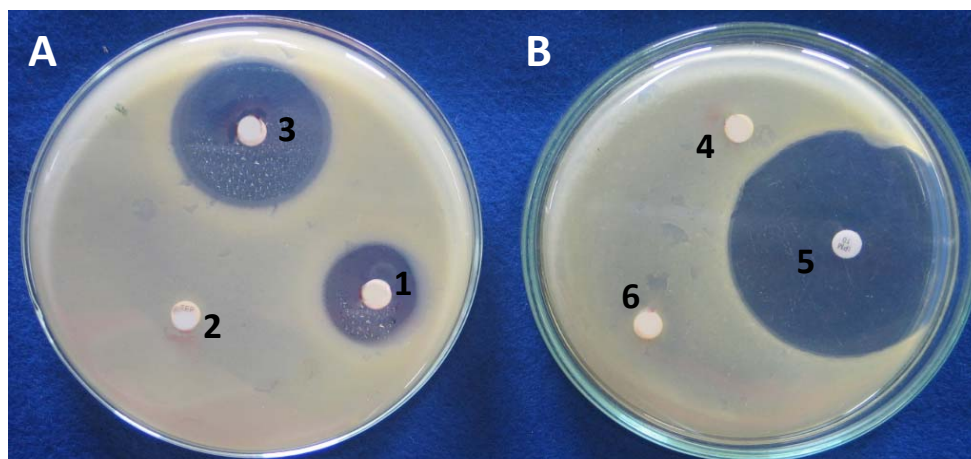


Figura 7- Antibiograma *in vitro*. A- Sensibilidade da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* aos antibióticos Amoxicilina (10 µg) (3) e Doxiciclina (30 µg) (1) com presença de halos de inibição, e insensibilidade a Estreptomicina (15 µg) (2); B- halo de inibição contra o antibiótico Tetraciclina (30 µg) (5) e insensibilidade a Cefalexina (30 µg) (4) e Cefadroxil (30 µg) (6).

Tabela 5- Sensibilidade da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a cinquenta substâncias antimicrobianas distintas, com presença (+) ou ausência (-) de halos de inibição.

Substâncias testadas	Halo	Substâncias testadas	Halo
	Presença/Ausência		Presença/Ausência
Ác. Nalidíxico (30 µg)	+	Doxiciclina (30 µg)	+
Ác. Oxolínico (30 µg)	+	Estreptomicina (15 µg)	-
Ác. Pipemídico (20 µg)	+	Fosfomicina (50 µg)	+
Ác. Clavulânico (30 µg)	+	Gentamicina (10µg)	+
Amicacina (30 µg)	+	Imipenem (10 µg)	+
Amoxicilina (10 µg)	+	Kanamicina (30 µg)	+
Ampicilina (10 µg)	+	Levofloxacina (5 µg)	+
Azitromicina (15 µg)	+	Lincomicina (2 µg)	+
Aztreonama (30 µg)	+	Lomefloxacina (10 µg)	+
Bacitracina (10µg)	+	Neomicina (30 µg)	+
Cefaclor (30 µg)	+	Nitrofurantoína (300 µg)	+
Cefadroxil (30 µg)	-	Norfloxacina (10 µg)	+
Cefalexina (30 µg)	-	Ofloxacina (5 µg)	+
Cefalotina (30 µg)	+	Optoquina (1 µg)	+
Cefazolina (30 µg)	+	Oxacilina (1 µg)	+
Cefepima (30 µg)	+	Penicilina (10 µg)	+
Cefotaxima (30 mg)	+	Rifampicina (5 µg)	+
Cefoxitina (30 µg)	+	Sulbactam (10 µg)	+
Cefprozil (30 µg)	+	Sulfazotrim (25 µg)	+
Ceftazidima (30 µg)	+	Sulfonamida (300 µg)	+

Continua...

...Continuação

Cefuroxima (30 µg)	+	Teicoplanina (30 µg)	+
Ciprofloxacina (5 µg)	+	Tetraciclina (30 µg)	+
Clarithromicina (15 µg)	+	Tobramicina (10 µg)	+
Clindamicina (2 µg)	+	Trimetoprim (5 µg)	+
Cloranfenicol (30 µg)	+	Vancomicina (30 µg)	+

4.5. Teste de repressividade

Os antibióticos estreptomicina (Estrep.), cefalexina (Cefal.) e cefadroxil (Cefad.) que não inibiram o crescimento da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tanto no teste qualitativo quanto quantitativo, foram escolhidos para comporem o meio semi-seletivo. Contudo, para cautela adicional, eles foram selecionados para o estudo de repressividade sendo testados isoladamente e em todas as combinações possíveis. O estudo da curva de crescimento foi realizado por turbidimetria, comparando-se os tratamentos que utilizaram os antibióticos testados com o tratamento sem antibiótico (Padrão).

Com o estudo da curva de crescimento contendo os antibióticos isoladamente na concentração de 50 mg/L foi observado um pequeno efeito inibitório dos fármacos estreptomicina (2 %) e cefalexina (8 %) no crescimento do patógeno, quando comparado com meio sem antibiótico (100 % de crescimento). No tratamento com cefadroxil (23 %), o efeito sob o crescimento do patógeno foi maior quando comparado com o tratamento sem antibiótico (100 % de crescimento) (Figura 8). Os tratamentos com as concentrações de 100 mg/L obtiveram maior repressividade com efeito inibitório de 23 % para estreptomicina, 35 % para cefalexina e mais expressivamente para cefadroxil com 62 % de inibição, em relação ao tratamento sem antibiótico (100 % de crescimento) (Figura 9). Os resultados demonstraram que o antibiótico cefadroxil em ambas as concentrações possui maior potencial inibitório sob a fitobactéria, com ação mais expressiva a 100 mg/L.

A combinação dos antibióticos dois a dois com concentrações de 50 mg/L apresentou efeito inibitório abaixo de 50%, com maior inibição para o combinado cefadroxil+cefalexina (46 %), seguidos por estreptomicina+cefadroxil (23 %) e estreptomicina+cefalexina (23 %), quando comparados com o meio sem antibióticos (100 % de crescimento) (Figura 10). As concentrações de 100 mg/L inibiram o

crescimento do isolado, não havendo crescimento no combinado cefadroxil+cefalexina e, apresentando inibição de 62% para estreptomicina+cefadroxil e 42 % para estreptomicina+cefalexina, em relação ao tratamento sem antibióticos (100 % de crescimento) (Figura 11). Os tratamentos contendo cefalexina+cefadroxil nas duas concentrações (50 mg/L e 100 mg/L) apresentaram efeitos significativos no crescimento da fitobactéria, com 100 % de inibição na maior concentração, possivelmente devido ao efeito sinérgico acentuado nestes combinados, já que isoladamente, ambos apresentaram maior efeito repressivo. No entanto, os demais combinados também apresentaram efeito sinérgico, mas não tão eficiente.

O estudo com os três fármacos combinados em concentrações de 50 mg/L apresentou efeito inibitório de 38 % quando comparado com o meio sem antibióticos (100 % de crescimento) (Figura 12). Em contrapartida, não houve crescimento do isolado para a concentração de 100 mg/L (Figura 13). A ação dos três antibióticos conjuntamente na maior concentração (100 mg/L) possui efeito inibidor, possivelmente devido à combinação de cefadroxil+cefalexina que suprimiram o crescimento da fitobactéria como apresentado na Figura 11. Com isso, não é possível afirmar qual o efeito da estreptomicina ao combinado. No entanto, os três antibióticos apresentaram menor efeito inibitório (38 %) em relação ao combinado cefadroxil+cefalexina (46 %) na concentração de 50 mg/L (Figuras 10 e 12), possivelmente a adição da estreptomicina ao combinado reduziu o efeito sinérgico ocasionando o menor efeito inibitório.

Com o estudo do crescimento da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em meio líquido contendo os antibióticos isoladamente e em todas as combinações, foi possível afirmar que, o antimicrobiano cefadroxil apresentou maior efeito inibitório isoladamente e combinado com estreptomicina e cefalexina nas duas concentrações testadas. Isso nos permite afirmar que o mesmo possui maior efeito sinérgico sobre o patógeno em relação aos outros antibióticos (estreptomicina e cefalexina). A estreptomicina foi o antibiótico que exibiu menor efeito inibitório sobre o crescimento do patógeno, tanto isoladamente quanto combinado com cefalexina, mostrando possuir menor efeito sinérgico sobre o mesmo.

Na concentração de 50 mg/L o combinado estreptomicina + cefadroxil apresentou mesma ação inibitório em relação ao combinado estreptomicina + cefalexina. No entanto, os antibióticos estreptomicina e cefalexina foram escolhidos

para comporem o meio semi-seletivo na concentração de 50 mg/L, por apresentarem menor efeito inibitório isoladamente e em todas combinações possíveis (Figura 10).

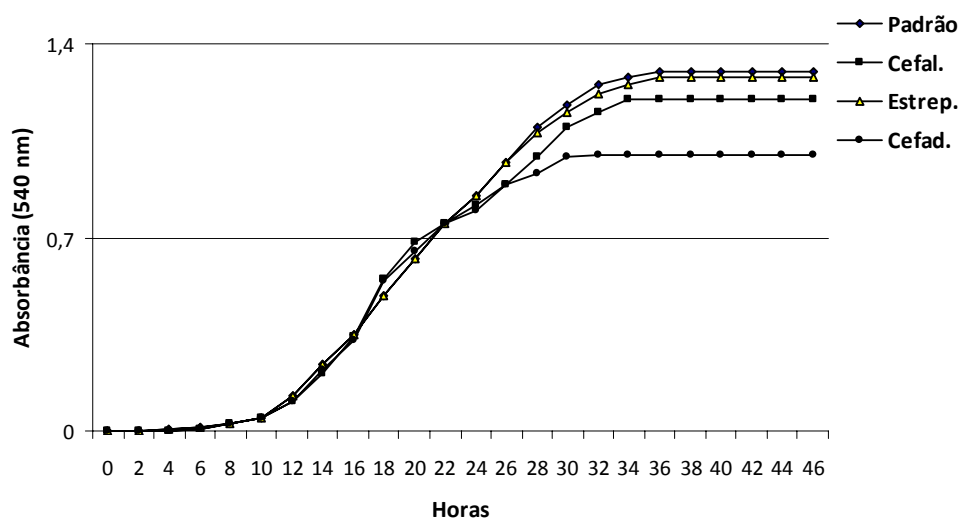


Figura 8- Curva de crescimento do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sob ação dos antibióticos estreptomicina (Estrep.), cefalexina (Cefal.) e cefadroxil (Cefad.) a 50 mg/L, em comparação com a curva em meio sem antibiótico (Padrão).

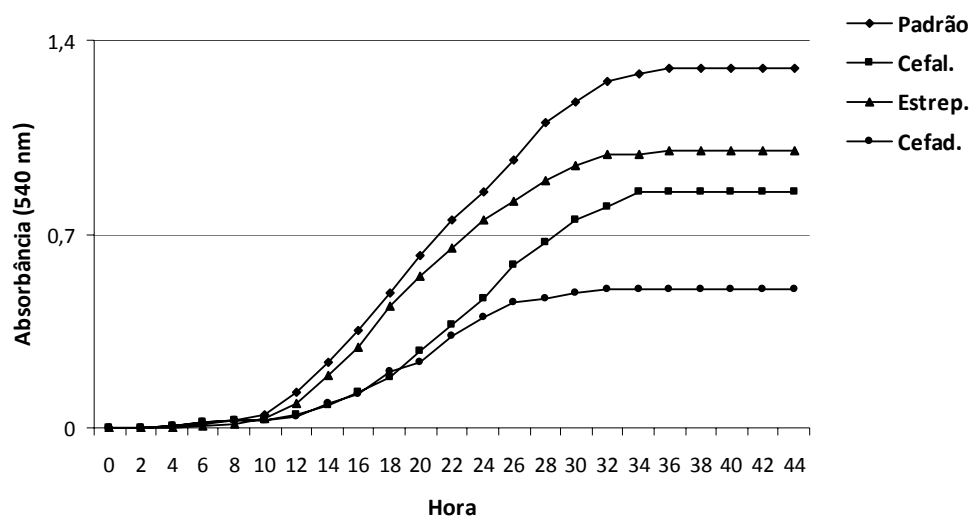


Figura 9- Curva de crescimento do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sob ação dos antibióticos estreptomicina (Estrep.), cefalexina (Cefal.) e cefadroxil (Cefad.) a 100 mg/L, em comparação com a curva em meio sem antibiótico (Padrão).

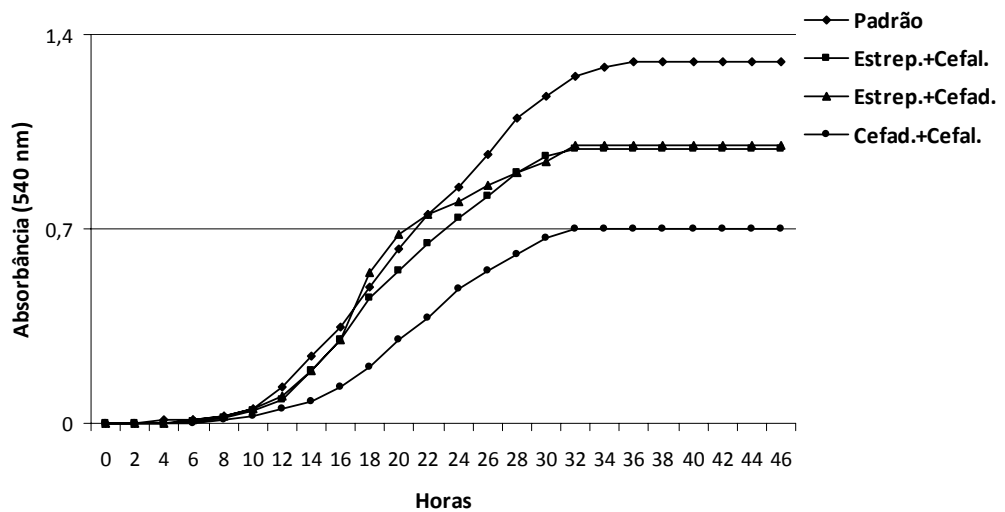


Figura 10- Curva de crescimento do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sob ação dos antibióticos estreptomicina + cefalexina (Estrep. + Cefal.), estreptomicina + cefadroxil (Estrep. + Cefad.) e cefalexina+cefadroxil (Cefad + Cefal.) a 50 mg/L, em comparação com a curva em meio sem antibiótico (Padrão).

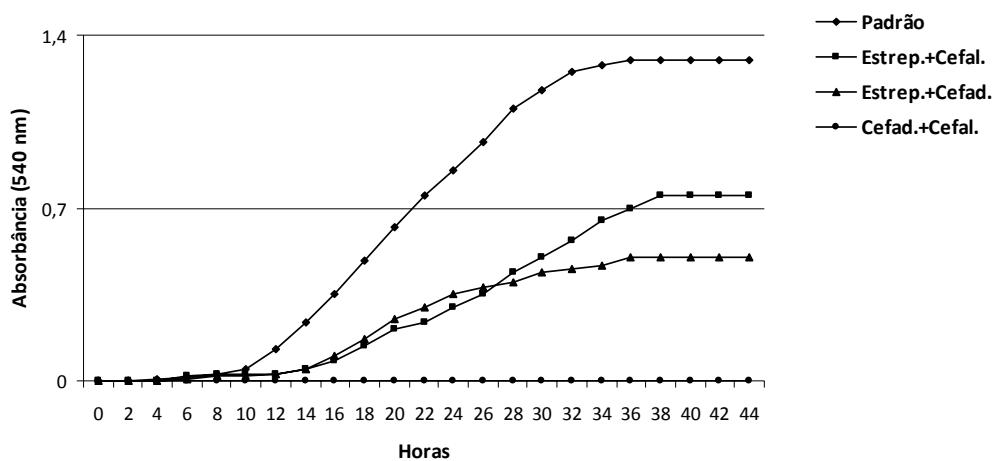


Figura 11- Curva de crescimento do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sob ação dos antibióticos estreptomicina + cefalexina (Estrep. + Cefal.), estreptomicina + cefadroxil (Estrep. + Cefad.) e cefalexina+cefadroxil (Cefad + Cefal.) a 100 mg/L, em comparação com a curva em meio sem antibiótico (Padrão).

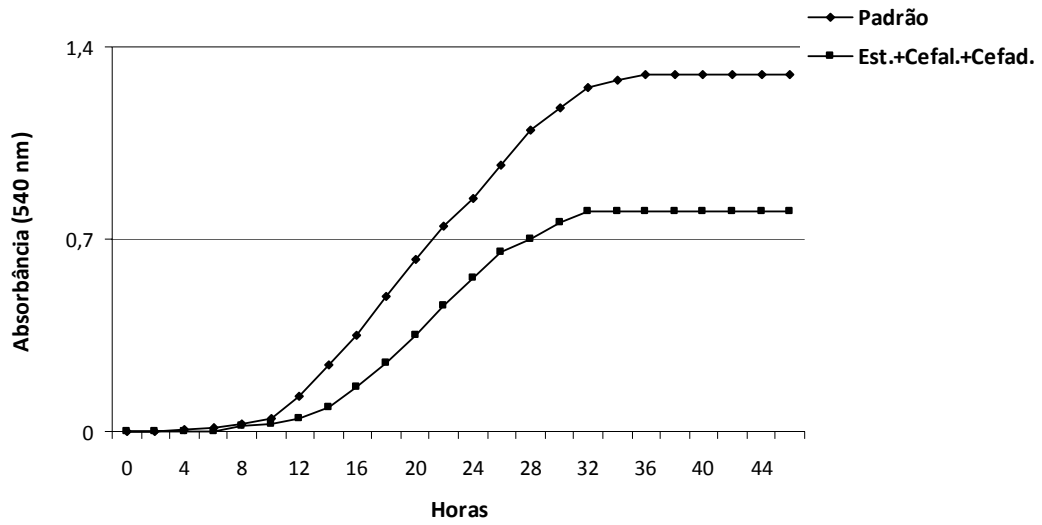


Figura 12- Curva de crescimento do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sob ação dos antibióticos estreptomicina + cefalexina + cefad. (Estrep. + Cefal. + Cefad.), a 50 mg/L, em comparação com a curva em meio sem antibiótico (Padrão).

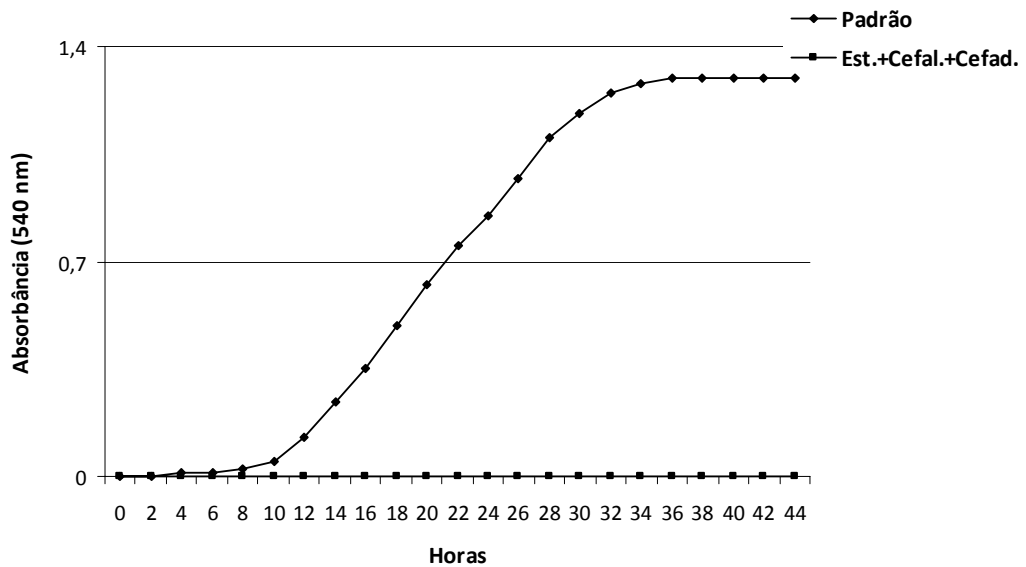


Figura 13- Curva de crescimento do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sob ação combinada dos antibióticos estreptomicina + cefalexina + cefadroxil (Estrep.+ Cefal.+ Cefad.) a 100 mg/L, em comparação com a curva em meio sem antibiótico (Padrão).

4.6. Bioensaio *in vivo* e com folíolos destacados para estudo das tendências populacionais do patógeno bacteriano na presença dos antagonistas selecionados

Os resultados *in vivo* revelaram que o isolado RFK-24 apresentou a menor média de lesões por folíolo (2,5) em relação ao controle (média de 5,0 lesões por folíolos), não diferindo do tratamento com AMQ-CB. Neste ensaio também foi observado que o isolado RFS-183 não diferiu do controle, apresentado em média 4,7 lesões por folíolo, comparado com o controle que apresentou em média 5,0 lesões por folíolo (Figura 14).

O ensaio com folíolos destacados mostrou que dentre os tratamentos, o AMQ-CB e RFK-24 exibiram a menor média de U.F.C/g de tecido foliar, quando comparado com o controle. O contrário foi exibido pelo isolado RFS-183 que apresentou $17,9 \times 10^4$ de U.F.C/g de tecido foliar em relação ao controle ($18,3 \times 10^4$ de U.F.C/g de tecido foliar), não diferindo do mesmo (Figura 15).

De acordo com os resultados dos ensaios *in vivo* e em folíolos destacados, os tratamentos AMQ-CB e RFK-24 se destacaram como efetivos no controle da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Em contrapartida, o isolado RFS-183 não proporcionou controle satisfatório do patógeno, igualando-se ao controle (água) nos dois ensaios.

Os dados de severidade de doença obtidos em condições de casa-de-vegetação correlacionaram-se positivamente com os de folíolos destacados realizado em laboratório. O coeficiente de correlação foi $r = 0,7$ com 5% de significância.

Notadamente, o uso do meio semi-seletivo permitiu estudar as tendências populacionais em filoplano de tomateiro expostos aos diferentes tratamentos de maneira tão eficiente quanto o experimento de controle biológico em casa-de-vegetação. Tal fato abre possibilidade para o emprego desta técnica na seleção de agentes de biocontrole e ao mesmo tempo, permite a investigação da habilidade desses microrganismos em reduzir as populações de patógenos no filoplano.

O uso de folíolos destacados em comparação com a seleção massal, mostrou-se vantajoso para a seleção de residentes de filoplano, pois além de possibilitar o aumento do número de repetições o experimento foi concluído em três dias, se comparado com a seleção massal que foi concluída em um ano. As condições de ambiente também foram controladas, o que não ocorreu na seleção massal em casa-de-vegetação, pois houve aumento da severidade de doença pelo patógeno

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* em épocas de temperatura mais elevada (item 4.1, Pag. 19). O uso de folíolo destacado também possibilita o estudo das tendências populacionais do patógeno ao longo do tempo, bem como a investigação das interações entre planta-patógeno-antagonista, o que não é possível na seleção massal (PUSEY, 1999).

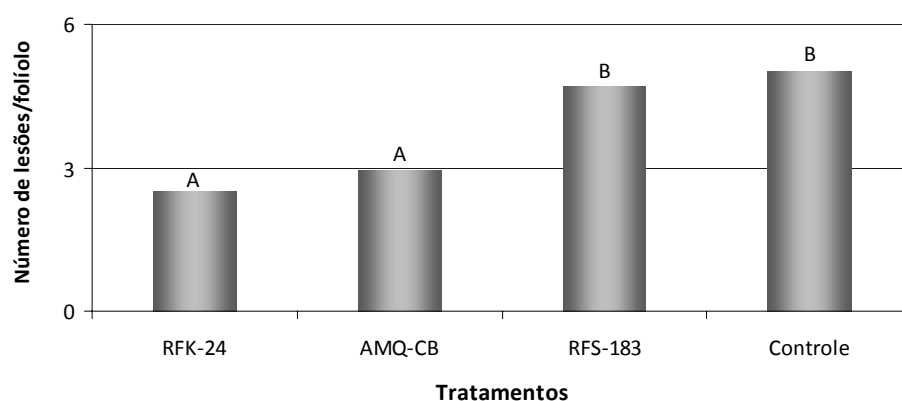


Figura 14- Quantificação de doenças em folíolos de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada' previamente expostos aos tratamentos e depois inoculado com suspensão de células de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. As colunas apresentadas correspondem às médias.

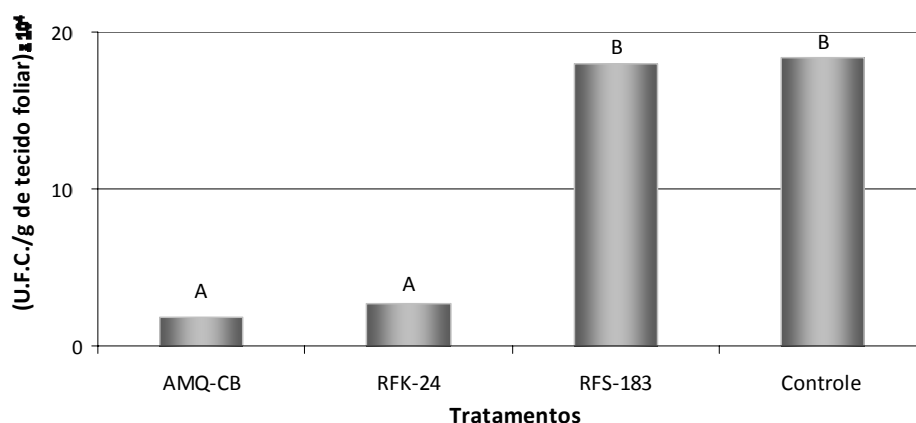


Figura 15- Magnitude das populações de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em filoplano de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada' previamente expostas aos tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As colunas apresentadas correspondem às médias.

4.7. Bioensaio *in vivo* e com folíolos destacados para determinar a correlação entre a severidade da doença e a inibição da germinação de conídios do patógeno fúngico (*Alternaria solani*) na presença dos antagonistas

O ensaio *in vivo* mostrou que os tratamentos com AMQ-CB e RFK-24 controlaram com maior intensidade a pinta preta, e que ambos apresentaram menor número de lesões por folíolo (827 e 1034), quando comparado com o controle (1664 lesões por folíolo). O isolado RFS-183 mostrou-se pouco promissor no controle do patógeno, exibindo 1557 lesões por folíolo, em comparação com o controle (1664 lesões por folíolo) (Figura 16).

Para o ensaio com discos de tecido foliar previamente expostos aos tratamentos, quando se avaliou germinação dos conídios de *Alternaria solani* foi observado que o isolado RFK-24 inibiu com maior intensidade a germinação dos conídios, proporcionando 75 % de inibição da germinação, quando comparado com o controle (nenhuma inibição da germinação). Os tratamentos AMQ-CB e RFS-183 não diferiram do controle, embora tenham exibido, respectivamente, 50 % e 31 % de inibição da germinação de conídios, em relação ao controle que não apresentou nenhuma inibição (Figura 17).

Com os resultados apresentados pôde-se observar analogia entre os ensaios *in vivo* em disco de folíolo destacado, em que apresentaram correlação positiva ($r= 0,6$) a 5% de significância. Para tal, o uso de discos de folíolo destacado mostrou-se eficiente quando comparado ao ensaio em casa-de-vegetação, possibilitando investigar *in situ* a interação planta-patógeno, salvaguardando as condições naturais do filoplano. A técnica abre precedentes para o emprego na seleção de agentes de controle biológico, com vantagens de diminuir o espaço em casa-de-vegetação, evitando inocular plantas inteiras e obtendo maior controle das condições de ambiente (NICHOLSON *et al.*, 1972).

A técnica proporcionou conduzir o experimento em condições controladas de ambiente. O que não ocorreu em casa-de-vegetação, como citado no item 4.1 (Pag. 19), em que houve aumento da severidade de doença pelo patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em épocas de temperatura mais elevada. Outro aspecto importante a ser comentado é o controle da luminosidade do ambiente, pois em casa-de-vegetação plantas recebem maior ou menor intensidade de luz solar, favorecendo ou prejudicando a efetividade da infecção pelo patógeno, conseqüentemente aumentando o erro experimental. Em trabalho realizado por WALKER (1983), o

mesmo mostrou a importância da intensidade de luz na efetividade do patógeno *Alternaria cassiae* quando exposta a luminosidade solar direta, obtendo maior severidade de doença.

O menor tempo na condução do experimento também é fator importante, pois possibilita o aumento do número de repetições, diminuindo o erro experimental e aumentando a confiabilidade dos dados obtidos. Isto foi observado na técnica de folíolos destacados, para qual o experimento foi concluído em três dias. O contrário foi observado em casa-de-vegetação, em que o experimento foi conduzido no período de um ano (item 4.1, Pag. 19).

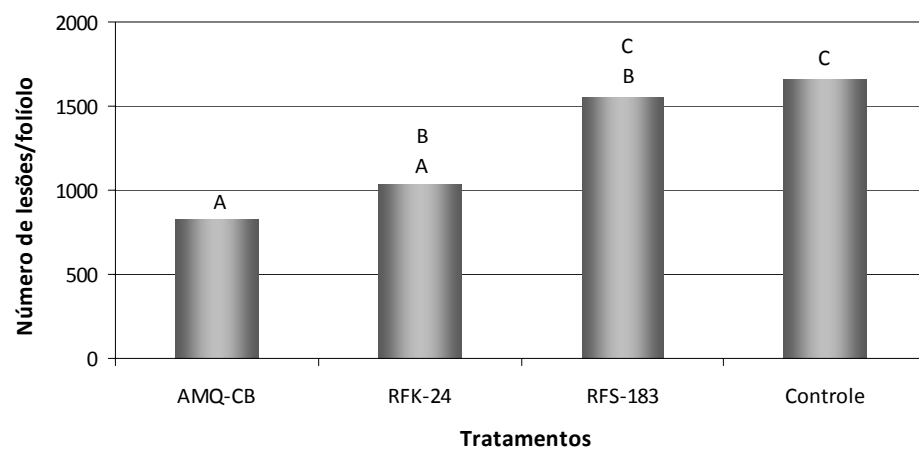


Figura 16- Média da porcentagem de conídios germinados de *Alternaria solani* em filoplano de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada' previamente expostos aos tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. As colunas apresentadas correspondem às médias.

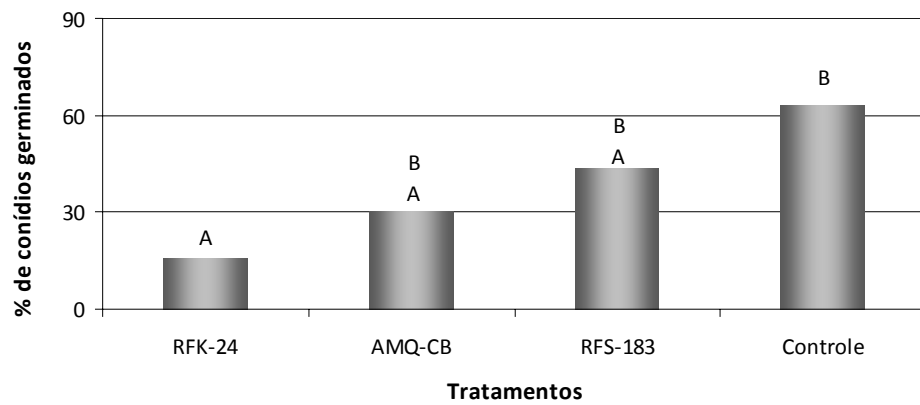


Figura 17- Quantificação de doenças em folíolos de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada' previamente expostos aos tratamentos e depois inoculado com suspensão de conídios de *Alternaria solani*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. As colunas apresentadas correspondem às médias.

5.0. Conclusões

- 300 isolados foram obtidos a partir de folíolos de tomateiros coletados na micro-região de Viçosa-MG.
- A seleção massal dos 300 isolados foi executada em duas etapas, numa primeira etapa 79 isolados apresentaram capacidade de reduzir, em média, 82 % da severidade de doença. Desses, numa segunda etapa, 33 isolados apresentaram redução média da severidade de doença em 50 %.
- O meio modificado de Simmons permitiu a individualização de 58 % dos isolados promissores em relação ao meio 523 (48 %).
- Nos testes de antibiose dos 33 isolados mais promissores contra patógenos do tomateiro, somente dois (RFS-183 e RFK-24) inibiram o crescimento de mais de um patógeno e, por isso, foram objetos da seleção final.
- Os ensaios com folíolos destacados mostraram-se tão eficientes quanto os experimentos em casa-de-vegetação, podendo ser utilizado como seleção de potenciais agentes de biocontrole.

6.0. Referências Bibliográficas

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: New York: Academic Press. ed. 635p., 1997.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 145-180, 2000.

APPEL, M.; HAMPF, M.; MANSVELT, L.; HAPGOOD, J.; BELLSTEDT, D. Amplification, sequence and expression of the harpin encoding gene of the bacterial canker pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain NV. **Journal of Plant Physiology**, v. 154, p. 489-497, 1999.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: San Francisco.: W. H. Freeman. ed. 433p., 1974.

BARGABUS, R.L.; ZIDACK, J.E.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 289-298, 2002.

BARRETTI, P.B. Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencial para o biocontrole de enfermidades do tomateiro. 2001. p. **Tese de Mestrado** (Departamento de Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - Brasil, 2001.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2043-2050, 2000.

BASHAN, Y.; DIAB, S.; OKON, Y. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the Soil. **Plant and Soil**, v. 68, p. 161-170, 1982a.

BASHAN Y.; OKON Y.; Y., H. Long term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, v. 72 p. 1143-1144, 1982b.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 145-172, 1995.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353-359, 1999.

BLAKEMAN, J.P. Phylloplane interactions use of bacteria against fungi, epiphytic bacteria against pathogenic bacteria. **Phytopathogenic prokaryotes / edited by M.S.**, v. G.H. Lacy. New York, p. 1982, 1982.

BORA, T.; OZAKTAN, H.; GORE, E.; ASLAN, E. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, p. 471-475, 2004.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, F.J.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, D.; JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v. 89, p. 328-335, 1999.

BOWERS, J.H.; KINKEL, L.L.; JONES, R.K. Influence of disease-suppressive strains of *Streptomyces* on the native *Streptomyces* community in soil as determined by the analysis of cellular fatty acids. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 27-37, 1996.

BRADBURY, J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. C. A. B. International, **Anais**. p. 332, 1993.

BRAUNBERGER, P.G.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Early vesicular-arbuscular mycorrhizal colonisation in soil collected from an annual clover-based pasture in a Mediterranean environment: soil temperature and the timing of autumn rains. **Austrian Journal Agriculture Review**, v. 48, p. 103-110, 1997.

CAFATI, C.R.; SAETTLER, A.W. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. **Phytopathology**, v. 70, p. 675-679, 1980.

CAMARGO FILHO, W.P.; MAZZEI, A.R. Mercado mundial de tomate e o mercosul. **Informe Econômico.**, v. 27, p. 25-38, 1997.

CANÇADO JÚNIOR, F.L.; FILHO, C.W.P.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M.; MAZZEI, A.R.; ALVES, H.S. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para mesa. **Informe Agropecuário**, v. 24, p. 7-18, 2003.

COOKSEY, D.A. Reduction of infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using a nonpathogenic, cooper-resistant strain combined with a cooper bactericide. **Phytopathology**, v. 78, p. 601-603, 1988.

DOIDGE, E.M. Atomato canker. **Annual Applied Biology.**, v. 7, p. 407-430, 1921.

DUVAL, A.M.Q. Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas a mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil. 2003. p. 123. **Tese de Doutorado**. (Departamento de Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003.

ERCOLANI, G.L. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the Influence of leaf age and sampling time. **Microbial Ecology**, v. 21, p. 35-48, 1991.

ETEBARIAN, H.R.; SHOLBERG, P.L.; EASTWELL, K.C.; SAYLER, R.J. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 591-598, 2005.

FAO FAOSTAT. (<http://apps.fao.org>), 2006.

FERNANDO, W.G.D.; WATSON, A.K.; PAULITZ, T.C. Phylloplane *Pseudomonas* spp enhance disease caused by *Colletotrichum coccodes* on velvetleaf. **Biological Control**, v. 4, p. 125 -131, 1994.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura-agrotecnológica moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV. ed. 402p., 2000.

GARDNER, M.W.; KENDRICK., J.B. Bacterial spot of tomato. **Journal. Agriculture Review**, v. 21, p. 123-156, 1921.

GARDNER, M.W.; KENDRICK, J.B. Bacterial spot of tomato. **Phytopathology**, v. 13, p. 307-315, 1923.

GITAITIS, R.; McCARTER, S.; JONES, J.B. Disease control in tomato transplants produced in Georgia an Florida. **Plant Disease**, v. 76, p. 651-656, 1992.

GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 353-378, 1997.

GOODE, M.J.; SACCER, M. Prevention- the key the controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, v. 64, p. 831-834, 1980.

GUZZO, S.D.; HAKAKAVA, R.; MARTINS, E.M.F.; ROVERATTI, D.S. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloretos de benzalcônio (composto de amônio quaternário). **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 339-345, 1999.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; ROMEIRO; R.S.; MIZUBUTI., E.S.G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 638-643, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA, J.R.; ROMEIRO, R.D.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.

HALFELD VIEIRA, B.A. Bactéria residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 p. **Tese de Doutorado** (Departamento de Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Minas Gerais, 2002.

HANDELSMAN, J.; RAFFEL, S.; MESTER, E.H.; WUNDERLICH, L.; GRAU, C.R. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 713-718, 1990.

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant-pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 243-269, 1983.

IACOBELLIS, N.S.; SISTO, A.; SURICO, G. Occurrence of unusual strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive in central Italy. **Bulletin OEPP**, v. 23, p. 429-435, 1993.

IBGE. ESTADOSAT <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>, 2007.

ISHMARU, C.A.; KLOS, E.J.; BRUBAKER, R.R. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. **Phytopathology**, v. 78, p. 746-750, 1988.

JACOBS, J.L.; SUNDIN, G.W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5488-5496, 2001.

JONES, J.B. Bacterial spot. In: JONES, J.B.J., J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. Compendium of tomato desiasse. St. Paul: **America Phytopathological Society Press**. ed. pp.27, 1997.

JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. Compendium of Tomato Diseases. **America Phytopathological Society Press**, v. p. 73p., 1991.

JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SHAAD, N.W. Reclassification of *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and Pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 755-762, 2004

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KEARNS, L.P.; MAHANTY, H.K. Antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh1087: Its role in inhibition of *Erwinia amylovora* and partial

characterization of antibiotic biosynthesis genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. p. 1998.

KERLING, L.C.P. De microflora op blad van *Beta vulgaris*. **Tijdschr Plantenziekten**, v. 64, p. 402 - 410, 1958.

KHMEL, I.A.; SOROKINA, T.A.; LEMANOVA, N.B.; LIPASOVA, V.A.; METLITSKI, O.Z.; BURDEINAYA, T.V.; CHERNIN, L.S. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, p. 45-57, 1998.

KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 327-347, 1997.

KLEMENT, Z.R., K. AND SANDS, D. C. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó. ed. 568p., 1990.

KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S.S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: Evaluation of a marker gene and formulations. **Biological Control**, v. 13, p. 158-165, 1998.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: **CERES Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: 3 ed. pp.690-719, 1997a.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. v. 2, p. 690-719, 1997b.

LAST, F.T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 48, p. 221 - 229, 1955.

LAST, F.T.; DEIGHTON, F.C. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 48, p. 83 - 99, 1965.

LAWRENCE, C.A. Germicidal properties of cationic surfactants. In: JUNGERMANN, E. **Cationic surfactants**. New York: Marcel Dekker. ed. pp.492-521, 1970.

LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 3, p. 209, 1965.

LEBEN, C. Colonization of soybean buds by bacteria - observations with scanning electron microscope. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 319, 1969.

LEBEN, C. How plant pathogenic survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-637, 1981.

LEBEN, C. Relative-humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**, v. 78, p. 179-185, 1988.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 238-243, 2002.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa-CNPq. ed. 70 p., 1997.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. Controle químico da mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 21-22, 1999.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPq. ed. 61p., 1994.

LOPES, M.C.; STRIPARI, P.C. A cultura do tomateiro. In: GOTO, R.; TIVELLI, S.W. (Ed.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais.**, v. p. 257-304, 1998.

LUZ, W.C. Efeito dos microorganismos do filoplano sobre as manchas fúngicas foliares do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 73-78, 1985.

MACAGNAN, D. Bactérias endosporogênicas e actinomicetos residentes de frutos de cacaueteiro como agentes de biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão parda (*Phytophthora* ssp). 2005. **Tese de Doutorado em Fitopatologia** (Departamento de Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MARIANO, R.L.R.; McCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on Tomato and Selected Weed Species. **Microbial Ecology**, v. 26, p. 47-58, 1993.

MARINGON, A.C.; KUROSZAWA, C.; BARBOSA, V.; C., S.N.J. Controle químico da mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DOIDGE) DYE) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 92-101, 1986.

MAY, R.; VOLKSCH, B.; KAMPMANN, G. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* in vitro and in planta. **Microbial Ecology**, v. 34, p. 118-124, 1997.

McBAIN, A.J.; LEDDER, R.G.; MOORE, L.E.; CATRENICH, C.E.; GILBERT, P. Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3449-3456, 2004.

MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 369-374, 2000.

MEW, T.W.; MEW, I.P.C.; HUANG, J.S. Scanning electron-microscopy of virulent and avirulent strains of *Xanthomonas campestris* pv *oryzae* on rice leaves. **Phytopathology**, v. 74, p. 635-641, 1984.

MEW, T.W.; VERA CRUZ, C.M. Epiphytic colonization of host and non-host plants by phytopathogenic bacteria. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J.V.D. **Microbiology of the Phyllosphere**. New York: Cambridge University Press. ed. pp.269-282, 1986.

MEYER, G.D.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y.; HOFTE, M.; DE MEYER, G. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 279-286, 1998.

MEZIANE, H.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C.; HÖFTE, M.; BAKKER, P.A.H.M. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 177-185, 2005.

MILES, W.G.; DAINES, R.H.; RUE, J.W. Presymptomatic egress of *Xanthomonas pruni* from infected peach leaves. **Phytopathology**, v. 67, p. 895-897, 1977.

MIZUBUTTI, E.S.G.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Doenças causadas por fungos em tomateiro. Belo Horizonte: **Informe Agropecuário**. 1996.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y.; BEER, S.V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**, v. 86, p. 856 - 863, 1996.

NAKAJIM, T., ODA, M.; SHIGEMATSU, T. Inhibitory activity of quaternary ammonium polymers against *Tobacco mosaic virus* infection. **Journal of Pesticide and Science**, Tokyo, v. 8, p. 1983.

NEILANDS, J.B. Siderophore systems of bacteria and fungi. In: BEVERIDGE, T.J.; DOYLE, R.J. **Metal Ions and Bacteria**. New York: John Wiley & Sons. ed. pp.141-163, 1989.

NICHOLSON, R.L.; VAN SCOYOC, S.; KUC, J.; WILLIAMS, E.B. Response of detached apple leaves to *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v. 63, p. 649-650, 1972.

OOSTERHOF, J.J.H.; BUIJSSEN, K.; BUSSCHER, H.J.; VAN DER LAAN, B.; VAN DER MEI, H.C. Effects of quaternary ammonium silane coatings on mixed fungal and bacterial biofilms on tracheoesophageal shunt prostheses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3673-3677, 2006.

PABITRA, K.; BORA, L.C.; BHAGABATI, K.N.; KALITA, P. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, v. 49, p. 234-237, 1996.

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J. Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1264-1268, 1996.

PUSEY, P.L. Laboratory and field trials with selected microorganisms as biocontrol agents for fire blight. **Acta-Horticulturae.**, v. (489), p. 655-661, 1999.

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M.H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 51, p. 13-16, 1984.

ROMEIRO, R.D.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa-MG: Editora UFV. 2 ed. 333p., 2005.

ROMEIRO, R.S. Antibiogramas com Discos de Papel. In: **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV. 1 ed. pp.136-139, 2001a.

ROMEIRO, R.S. Bioensaio em placas com cavidades em dupla camada de gel. In: **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV. ed. pp.140-141, 2001b.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, Minas Gerais - Brasil: Editora UFV. 1 ed. 279p., 2001c.

ROMEIRO, R.S.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; GARCIA, F.A.O.; DEUNER, C.C.; MIZUBUTI, E.S.G. Investigação sobre a atividade antimicrobiana de um isolado de *Pseudomonas putida* contra *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 365, 2001d.

SILVA, H.S.A. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares e como promotoras de crescimento em tomateiro. 2002. 115 p. **Tese de Doutorado em Fitopatologia** (Departamento de Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2002.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, I.B. Produção mundial e nacional. **Tomate para processamento industrial**, p. 168, 2000.

SIMMONS, J.S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. **Journal Infective Disease**, v. 39, p. 209-214, 1926.

SUTIC, D. Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd), v. 6, p. 1-65. English summary. **Review Applied Mycology**. 36, 734-735, 1957.

THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J.; FENLON, J.S.; FERMOR, T.R.; LILLEY, A.K.; LYNCH, J.M.; McCORMACK, P.J.; McQUILKEN, M.P.; PURDY, K.J.; RAINEY, P.B.; WHIPPS, J.M. Quantitative and qualitative seasonal-changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar-beet (*Beta vulgaris*). **Plant and Soil**, v. 150, p. 177-191, 1993.

TIMMER, L.W.; MAROIS, J.J.; ACHOR, D. Growth and survival of Xanthomonads under Conditions Nonconducive to Disease Development. **Phytopathology**, v. 77, p. 1341-1345, 1987.

TÖFOLI, J.G. Pinta preta - uma ameaça constante aos cultivos da batata e do tomate. **Cultivar Hortaliças e Frutas**. In: PAULA, R.S.O. Resistência de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) ao patógeno *Alternaria solani*. ed. 2004.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods**. Minneapolis: Burgess Pub. Company. ed. 239p., 1969.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P.A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. In: UFV **Controle de doenças de plantas – hortaliça**. Viçosa: ed. pp.699-755, 2000.

VANNESTE, J.L.; YU, J.; BEER, S.V. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. **Journal Bacteriology**, v. 174, p. 2785-2796, 1992.

VIDAVER, A.K.; MATHYS, M.L.; THOMAS, M.E.; SCHUSTER, M.L. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology** v. 18, p. 705-713, 1972.

VIEIRA, B.D.A.H. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidade da parte aérea da cultura. 2002. 16-22 p. **Tese de Doutorado em Fitopatologia** (Departamento de Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2002.

WALKER, H.L. Control of sicklepod, showy croton and coffee senna with fungal pathogen. **United State America** , v. p. 360-390, 1983.

WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* pv. *fuscans* in field-grown navy beans. **Phytopathology**, v. 70, p. 500-506, 1980.

WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1435-1443, 1999.

WILSON, M.; LINDOW, S.E. Coexistence among epiphytic bacterial-populations mediated through nutritional resource partitioning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4468-4477, 1994.

YUEH, M.F.; NGUYEN, N.; FAMOURZADEH, M.; STRASSBURG, C.P.; ODA, Y.; GUENGERICH, F.P.; TUKEY, R.H. The contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A9 on CYP1A2-mediated genotoxicity by aromatic and heterocyclic amines. **Carcinogenesis (Oxford)**, v. p. 2001.