

**CRISTHIAN JAVIER GRABOWSKI OCAMPOS**

**BACTÉRIAS ISOLADAS DO FILOPLANO NO BIOCONTROLE  
DA ALTERNARIOSE E DA PODRIDÃO NEGRA DA COUVE**

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  
2010**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

G728b  
2010

Grabowski Ocampos, Cristhian Javier, 1980-  
Bactérias isoladas do filo plano no biocontrole da  
alternariose e da podridão negra da couve / Cristhian Javier  
Grabowski Ocampos. – Viçosa, MG, 2010.  
ix, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa  
Referências bibliográficas: f. 33-39

1. *Alternaria brassicicola*. 2. Couve - Doenças e pragas -  
Controle biológico. 3. *Xanthomonas campestris*.  
4. Podridão-negra. I. Universidade Federal de Viçosa. II.  
Título.

CDD 22. ed. 632.32

**CRISTHIAN JAVIER GRABOWSKI OCAMPOS**

**BACTÉRIAS ISOLADAS DO FILOPLANO NO BIOCONTROLE  
DA ALTERNARIOSE E DA PODRIDÃO NEGRA DA COUVE**

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: 15 de dezembro de 2010.

---

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

---

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

---

Prof. Luiz Antonio Maffia  
(Co-Orientador)

---

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues  
(Co-Orientador)

---

Prof. José Rogério de Oliveira  
(Orientador)

*Quem perde seus bens perde muito;  
quem perde um amigo perde mais;  
mas quem perde a coragem perde tudo  
(Miguel de Cervantes).*

*A minha querida família,  
amada esposa Lilian Victoria e  
adorado filho Matias Federico.*

*Ao Prof. Reginaldo da Silva Romeiro  
(in memoriam).*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e por ter colocado pessoas tão especiais na minha caminhada.

A meus pais, Estanislao e Aparícia (†), por acreditarem sempre em minha capacidade, e sogros, Sabadino e Mercedes, pelo apoio incondicional e constante para o logro de minhas metas.

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

À Universidad Nacional de Asunción (UNA), pelo apoio institucional, e ao Instituto de Biotecnología Agrícola (INBIO), pela bolsa concedida durante o curso.

Ao grande mestre Prof. Alfredo Stauffer e os colegas de trabalho Aida Orrego, Alicia Aquino, Dario Pino, Percy Salas, Laura Soilán, Graciela Gomez, Carmen Resquim e Juani do Departamento de Proteção Vegetal - Divisão Fitopatologia da UNA, pela confiança e apoio nos momentos difíceis.

Ao Professor José Rogério de Oliveira, pela amizade e orientação durante este período de formação acadêmica/científica.

Aos Professores Luiz Antonio Maffia, Francisco Xavier Ribeiro do Vale, Fabrício de Ávila Rodrigues e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pelos conselhos e incentivos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador da EMBRAPA-Roraima, Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, pelo apoio logístico/científico.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas da UFV, Hélvio, Márcio, Thais, Lívio, Adriana, Gilcianny, Maurício, Elisângela, Antônio e Sílvia, pela companhia e pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa.

Aos amigos que conquistei no mestrado, Thais, Geraldo, Ueder, Eder, Eleonora, Lívio, Pedro e Sueli; obrigado por tudo!

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante o curso

Ao Braz Tavares da Hora Júnior pela ajuda para o sequenciamento e a identificação das bactérias.

A todos os funcionários da UFV, em especial ao Bruno e à Sueli, laboratoristas do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas, pela sua paciência em atender a todos os estudantes.

Àqueles, que indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

CRISTHIAN JAVIER GRABOWSKI OCAMPOS, filho de Aparicia Ocampos Cardozo (†) e Estanislao Grabowski Aftica, nasceu em Itauguá, Departamento Central – Paraguai em 29 de novembro de 1980.

Em julho de 1999, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidad Nacional de Asunción (UNA) em San Lorenzo - Central, graduando-se em julho de 2005. É bolsista do Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur COSAVE e técnico do Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE). Desde março de 2006 é docente-pesquisador da Facultad de Ciencias Agrarias – UNA na área de Fitopatologia.

Em março de 2009, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, com concentração na área de Bacteriologia de Plantas, inicialmente sob a orientação do Prof. Reginaldo da Silva Romeiro e posteriormente do Prof. José Rogério de Oliveira, submetendo-se à defesa da dissertação em 15 de dezembro de 2010.

## ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A cultura da couve	4
2.2. A alternariose das brássicas	5
2.3. A podridão negra das brássicas	6
2.4. Bactérias do filoplano como potenciais controladores de doenças de plantas	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Isolamento e preservação das bactérias do filoplano de couve	11
3.2. Isolamento e preservação dos microrganismos fitopatogênicos	12
3.3. Seleção massal <i>in vitro</i>	12
3.4. Seleção massal <i>in vivo</i> em casa de vegetação	13
3.5. Confirmação do potencial antagonístico das bactérias selecionadas	14
3.6. Caracterização da potencialidade antagônica	14
3.6.1. Inibição do crescimento micelial de <i>Alternaria brassicicola</i> pelo método de pareamento de culturas	14
3.6.2. Inibição <i>in vitro</i> da germinação de conídios de <i>Alternaria brassicicola</i>	15
3.6.3. Produção de compostos voláteis inespecíficos pelas bactérias antagonistas	15
3.6.4. Produção de amônia	16
3.6.5. Produção de ácido cianídrico (HCN)	16
3.6.6. Produção de sideróforos	16
3.7. Compatibilidade dos antagonistas promissores	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Isolamento	18

4.2. Seleção massal <i>in vitro</i>	18
4.3 Seleção massal <i>in vivo</i>	19
4.4 Confirmação do potencial antagonístico das bactérias selecionadas	19
4.5. Caracterização dos potenciais antagonistas em ensaios laboratoriais	21
4.5.1. Inibição do crescimento micelial de <i>Alternaria brassicicola</i> pelo método de pareamento de culturas	21
4.5.2. Inibição <i>in vitro</i> da germinação de conídios de <i>Alternaria brassicicola</i>	21
4.5.3. Produção de amônia (NH <sub>3</sub> ) e outros compostos voláteis inespecíficos	21
4.5.4. Produção de ácido cianídrico (HCN)	22
4.5.5. Detecção de sideróforos	25
4.6. Compatibilidade dos antagonistas promissores	25
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

## RESUMO

GRABOWSKI OCAMPOS, Cristhian Javier, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Bactérias isoladas do filoplano no biocontrole da alternariose e da podridão negra da couve.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-Orientadores: Luiz Antonio Maffia e Fabrício de Ávila Rodrigues.

Investigou-se o potencial antagonístico de 324 bactérias residentes do filoplano da couve, agrupadas em produtoras de pigmentos fluorescentes, formadoras de endósporo e outras como antagonistas contra *Alternaria brassicicola*, agente causal da alternariose e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das brássicas. A seleção baseou-se em testes de seleção *in vitro* e experimentos *in vivo* em casa de vegetação, em duas etapas: seleção massal e confirmação da potencialidade dos agentes de biocontrole. Selecionaram-se dez isolados para o controle de cada patógeno. Para estudar o mecanismo envolvido no biocontrole, caracterizaram-se os 20 isolados em relação a diferentes mecanismos de antagonismo para controlar a alternariose e a podridão negra. Como mais promissores no experimento em casa de vegetação, destacaram-se o isolado UFV-215 para o controle da alternariose e o UFV-247 para o controle da podridão negra. Observou-se que os dois isolados foram compatíveis em testes *in vitro* e no controle das duas doenças em plantas de couve. Ambas as bactérias selecionadas apresentaram eficiência como agentes de biocontrole contra as doenças em estudo, em experimentos em casa de vegetação, demonstrando grande potencial para utilização no campo.

## ABSTRACT

GRABOWSKI OCAMPOS, Cristhian Javier, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december 2010. **Bacteria isolated from the phylloplane and biocontrol of alternaria diseases and black rot of collards.** Advisor: José Rogério de Oliveira. Co-Advisors: Luiz Antonio Maffia and Fabrício de Ávila Rodrigues.

An investigation was carried on observing the potential antagonism of 324 resident bacteria in the phylloplane of collards, grouped in: those producing fluorescent pigments; those forming endospores; and other antagonists. They were tested against alternaria leaf spot, caused by *Alternaria brassicicola*, and black rot, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. The selection was based on screening tests by means of *in vitro* and *in vivo* experiments in a greenhouse using mass selection and confirmation of the potential of biocontrol agents. Ten isolated one were selected for the control of each pathogen. In order to study the mechanism involved in biocontrol, 20 isolated ones were characterized using different mechanisms of antagonism to reduce black rot and alternaria leaf spot. The strain UFV-215 gave the control for Alternaria leaf spot and the isolate UFV-247 for black rot. Both strains were consistent *in vitro* tests and to reduce both diseases on cabbage. Both bacteria showed efficiency as biocontrol agents against the diseases in greenhouse experiments, showing great potential for utilization under field conditions.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de hortaliças com 9.888.000 t produzidas anualmente. Na última década, a área cultivada com couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) e outras espécies da família Brassicaceae, comumente denominadas de brássicas, se manteve estável, em torno de 13.266 ha (FAO, 2010). Essa família abrange o maior número de culturas olerícolas (Filgueira, 2008), cujas espécies cultivadas possuem grande importância econômica para pequenos produtores, pois são culturas rentáveis em pequenas áreas. Também a couve tem sido objeto constante de pesquisa, devido à importância na alimentação humana, alto valor nutricional e elevada produtividade. Porém, como qualquer outra cultura, as brássicas apresentam problemas com doenças que diminuem o rendimento e limitam a produção.

Doenças de etiologia fúngica e bacteriana restringem a produção de brássicas em todo o mundo sendo a alternariose, causada por várias espécies de *Alternaria*, capaz de atingir as plantas nos diversos estágios de desenvolvimento e causar perdas de produção superiores a 50%. Outra doença destrutiva é a podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Essa é considerada a principal doença das brássicas, não somente em função dos prejuízos causados, mas também devido a sua ampla distribuição nas áreas de plantio (Rimmer *et al.*, 2007).

Patógenos causam danos consideráveis desde a fase de sementeira até a fase reprodutiva das plantas, prejudicando a cultura e limitando a produção, o que tem levado ao uso de defensivos químicos para o controle das doenças (Rimmer *et al.*, 2007; Lopes & Quezado-Soares, 1997). Tal uso tem levado a problemas como o da resistência dos microrganismos aos agrotóxicos utilizados, produção de alimentos contaminados com resíduos químicos e degradação do ambiente com redução da diversidade das espécies benéficas.

A busca por alternativas viáveis, eficientes e tecnicamente comprovadas para o manejo de doenças e a redução do uso de produtos químicos em couve é uma

necessidade. No caso de hortaliças folhosas, o uso de produtos alternativos é interessante por serem as folhas o produto comercializado e consumido. Uma das alternativas mais atraentes é a utilização de agentes de controle biológico. O controle biológico é definido como “a redução da densidade de inóculo ou atividades determinantes da doença causada por um patógeno, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro, ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas” (Baker & Cook, 1974). Essa modalidade de controle proporciona o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e menos dependente dos produtos fitossanitários (Bettioli, 2009).

Dentre a diversidade de bactérias benéficas que existem na natureza, as endofíticas, as rizobactérias e as residentes do filoplano são passíveis de serem utilizadas como agentes de biocontrole (Halfeld-Vieira, 2002). Atualmente estão sendo utilizados no controle biológico da podridão negra residentes do filoplano (Massomo *et al.*, 2004), rizobactérias (Assis *et al.*, 1995), leveduras e outros fungos. Essas experiências foram promissoras e a severidade da doença foi reduzida em até 70% por leveduras do filoplano da couve (Assis *et al.*, 1999). Isolados de *Kluyvera ascorbata* e *Alcaligenes piechaudii* também reduziram a doença na cultura de repolho (assis *et al.*, 1998).

Na procura de agentes de controle biológico da alternariose foram encontrados isolados de *Streptomyces* sp. exercendo efeito fungistático sobre o patógeno (Ko *et al.*, 2010), *Bacillus pumilus* expressando genes de endoquitinase (Dehestani *et al.*, 2010) e reduzindo o tamanho da lesão, germinação e crescimento micelial de *Alternaria brassicicola* e antibiose *in vitro* exercido por *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* spp. e *Serratia* spp. isoladas de diferentes brássicas (Leifert *et al.*, 1992).

O uso de bactérias residentes do filoplano como agentes de controle biológico de enfermidades de plantas alicerça-se na possibilidade de elas serem capazes de atuar por antagonismo direto contra patógenos ou por indução de resistência (Romeiro, 2007a), com um impacto ambiental mínimo, o que pode levar à melhoria das técnicas de cultivo e evitar perdas acentuadas por doenças. Entretanto, a filosfera é ambiente complexo, que sofre variações intermitentes de componentes micro ambientais (Andrews & Hirano, 1991; Wilson *et al.*, 1999) como umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes. Conseqüentemente, a eficiência dos

agentes de biocontrole de doenças da parte aérea depende da capacidade de sobrevivência e de manutenção de populações em alta densidade (Halfeld-Vieira, 2004) nesse ambiente. Assim, na busca por procariotas residentes do filoplano como agentes de biocontrole é preciso prospectar e estudar suas potencialidades (Romeiro, 2007a).

O presente trabalho teve como objetivos: 1) isolar bactérias residentes de filoplano da couve; 2) selecionar agentes de biocontrole da alternariose e da podridão negra mediante bioensaios *in vitro* e experimentos *in vivo* em casa de vegetação; 3) determinar compatibilidade entre os isolados promissores; e 4) caracterizar as bactérias mais promissoras e determinar alguns mecanismos de antagonismo envolvidos no controle biológico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura da couve

A couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é, dentre as brássicas, a mais semelhante ao ancestral silvestre, caracterizando-se pela presença de caule ereto com folhas bem desenvolvidas, arredondadas, pecíolos longos e nervuras destacadas em forma de roseta ao redor do caule, sendo que a planta não forma cabeça (Filgueira, 2008; Messiaen *et al.*, 1995). Todas as variedades são reproduzidas por sementes e são cultivadas no outono-inverno, sendo bem adaptadas ao frio intenso e resistentes à geada. A época de plantio se projeta por vários meses, pois as plantas apresentam tolerância ao calor (Filgueira, 2008).

A couve lisa e antigos clones propagados vegetativamente são cultivados tradicionalmente em Minas Gerais e indistintamente chamados de tipo “Manteiga”. Entretanto, nos últimos anos foram introduzidos cultivares propagados por sementes e híbridos que competem com os clones antigos (Filgueira, 2008).

O crescimento e o rendimento das plantas dependem da disponibilidade de água, dos nutrientes do solo e da manutenção de alguns fatores do ambiente, como a temperatura, a luminosidade e a umidade. As plantas são altamente exigentes em água e, desse modo, as irrigações freqüentes melhoram a produtividade da planta (Filgueira, 2008). O nível de água disponível no solo deve se manter próximo a 100% ao longo do ciclo da cultura, o que favorece o desenvolvimento das doenças.

As doenças bacterianas e fúngicas da couve provocam perdas significativas pela destruição total ou parcial da planta ou do órgão vegetal comercializável: as folhas, que têm o seu valor econômico reduzido (Rimmer *et al.*, 2007). A alternariose, causada por *Alternaria brassicicola* (Schwn.) Wilt. e/ou *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc., e a podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, provocam consideráveis reduções na produtividade e na qualidade da planta (Rimmer *et al.*, 2007; Williams, 1980).

## 2.2. A alternariose das brássicas

A alternariose ou mancha de alternaria é uma doença fúngica comum e destrutiva em cultivos de brássicas. Embora existam pelo menos quatro espécies de *Alternaria* associadas à doença, duas delas — *A. brassicicola* e *A. brassicae* — prevalecem nos diversos países do mundo e também no Brasil (Reifschneider *et al.*, 1983). A alternariose causa danos consideráveis às plantas hospedeiras, desde a fase de mudas até a fase reprodutiva das plantas. As plântulas apresentam necrose dos cotilédones e hipocótilo, podendo ocorrer o tombamento e a morte, principalmente quando a infecção é sistêmica, o que acontece quando ocorre via sementes (Zambolim *et al.*, 1997). Quando as plantas são infectadas precocemente e sobrevivem, apresentam nanismo ou enfezamento e em plantas adultas os sintomas iniciais ocorrem nas folhas mais externas e posteriormente em todas as folhas (Rimmer *et al.*, 2007). As lesões características produzidas por *A. brassicae* são manchas arredondadas pequenas, escuras e necróticas que, quando se desenvolvem, tornam-se circulares, concêntricas e com halo clorótico. Essas lesões podem coalescer e, em ataques severos, observa-se o amarelecimento e a seca das folhas.

Sobre as lesões da alternariose, pode se observar massa pulverulenta e escura formada por conídios e conidióforos do fungo (Rimmer *et al.*, 2007). As sementes infectadas, quando jovens, são destruídas ou ficam chochas, enquanto as sementes maduras, ao serem infestadas e/ou infectadas, contêm o micélio dormente do fungo. As principais fontes de inóculo primário do patógeno são sementes contaminadas, restos de cultura infectados, plantas daninhas e hospedeiras espontâneas (Rimmer *et al.*, 2007).

No campo, a disseminação ocorre por meio do vento, da chuva, de ferramentas (Chen *et al.*, 2003) e de insetos (Dillard *et al.*, 1998), bem como por mudas infectadas (Maude & Humphersonjones, 1980). O conídio germina em presença de água e a penetração. Em geral, ocorre diretamente através da cutícula intacta, embora *A. brassicae* também possa penetrar pelos estômatos (Verma & Saharan, 1994).

A alternariose ocorre sob condições de umidade relativa elevada e o processo de infecção inicia-se com a deposição do inóculo na superfície do hospedeiro, na presença de água livre por 5 a 8 h, sendo 48 a 72 h o tempo para um ótimo estabelecimento do patógeno. *Alternaria brassicicola* causa infecção a 25°C e produz conídios entre 20 a 30°C, enquanto *A. brassicae* causa infecção a 15°C e requer temperaturas entre 18 a 24°C para esporulação. Em temperaturas ótimas para a esporulação, ambas as espécies produzem conídios dentro de 12 a 14 horas (Humphersonjones & Phelps, 1989).

O controle da alternariose baseia-se na utilização de sementes de alta qualidade, tratadas com fungicidas como thiram, pentacloronitrobenzeno ou iprodione (Babadoost *et al.*, 1993; Huang & Levy, 1995). Sementes sadias podem ser produzidas em plantas submetidas a aplicações frequentes, na parte aérea, de fungicidas como clorotalonil, iprodione ou mancozeb, em diferentes concentrações (Azevedo *et al.*, 2000). No entanto, existem relatos da prevalência crescente dessa doença e da diminuição do controle, que podem estar relacionados ao desenvolvimento de resistência em espécies de *Alternaria* em decorrência do uso excessivo de fungicidas dicarboximidas (iprodione e procimidona) e fenilpirrol (fludioxonil) (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004)

Como alternativa ao controle químico, o tratamento térmico de sementes a 50°C por 30 min (Nega *et al.*, 2003), a eliminação/incorporação dos restos de culturas infectados e a rotação de culturas durante dois a três anos são medidas eficientes (Peruch & Michereff, 2007) e indicadas para o manejo da doença.

O controle biológico de doenças de plantas tem mostrado ser uma alternativa de controle de fitopatógenos. O interesse nesta ciência tem sido incitado pela crescente preocupação pública sobre os efeitos potencialmente perigosos dos agrotóxicos e por algumas doenças que atualmente não têm controle ou só tem controle parcial, permitindo que atualmente sejam registrados produtos comerciais nos EUA e em outras partes do mundo (Owley & Windbam, 2010).

### **2.3. A podridão negra das brássicas**

A podridão negra das brássicas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), é uma doença severa em cultivos de verão. O patógeno é transmitido por sementes o que aumenta sua importância por serem estas culturas reproduzidas por este meio de propagação. As perdas podem atingir até 50% ou mais em condições favoráveis para a ocorrência da doença (Williams, 1980).

Plantas de qualquer estágio fenológico e principalmente órgãos aéreos são infectados. A bactéria penetra em cotilédones ou folhas jovens preferencialmente por hidatódios (Janse, 2005). Os primeiros sintomas da doença se manifestam na forma de manchas amareladas frequentemente em forma de “V” nas margens das folhas que progride até as nervuras, onde causa enegrecimento em consequência da desintegração do xilema (Rimmer *et al.*, 2007).

Todas as brássicas podem ser infectadas, incluindo ervas daninhas que podem ser portadoras assintomáticas da bactéria. O patógeno sobrevive no solo, em restos culturais de plantas doentes que ficam no campo (Schaad & White, 1974).

A dispersão da bactéria para outras plantas pode acontecer por chuva e vento ou por meios mecânicos, sendo as sementes a mais eficiente forma de dispersão do patógeno. A bactéria pode estabelecer populações epífitas em plantas não hospedeiras, sem causar sintomas.

A incidência da doença é maior quando as temperaturas oscilam entre 24–30°C, na presença de filme de água, que favorece a penetração da bactéria através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou por ferimentos provocados na superfície da parte aérea (Janse, 2005).

Para o controle da doença é recomendado a utilização de sementes certificadas, livre da bactéria, e semeio em solo livre de restos culturais de brássicas (Rimmer *et al.*, 2007). Além disso, o plantio de variedades resistentes, a eliminação de ervas daninha e a utilização de palha como cobertura de solo para evitar respingos de chuva são praticados com êxito no manejo da podridão negra (Willians, 1980).

Pulverização com oxiclreto de cobre e antigamente kasugamicina durante o período vegetativo imediatamente após vento e chuvas fortes gera proteção contra a podridão negra, sendo outra possibilidade de controle o tratamento de sementes com antibióticos pela imersão por 30 minutos em solução de aureomicina ou terramicina, na dosagem de 1 a 3g do antibiótico por litro de água (Fukaya *et al.*, 1988; Lopes & Quezado-Soares, 1997). Aliás, de todas estas alternativas, também foram identificadas fontes de resistência em repolhos e couves (Varalakshmi *et al.*, 2009).

#### **2.4. Bactérias do filoplano como potenciais controladoras de doenças de plantas**

A população microbiana no filoplano de plantas é muito complexa em sua constituição e existe uma grande diversidade de eventos e condições que determinam sua dinâmica (Kinkel, 1997; Kinkel *et al.*, 1996; Beattie & Lindow, 1995). Portanto, considera-se que, sendo um habitat comum para microrganismos, muitos deles podem apresentar potencialidade como agentes de controle biológico de doenças (Baker & Cook, 1974).

Bactérias associadas às folhas de plantas, ou filobactérias, provavelmente empregam uma gama de estratégias para colonização que inclui modificação do habitat

na folha pela formação de agregação, biofilmes. Esta modificação do local pode acontecer na superfície de folhas e também no interior das mesmas, podendo ser aumentada pela formação de agregados bacterianos, evidenciando a complexidade da ecologia da associação bactéria-folha (Beattie & Lindow, 1995). A folha é um habitat com características muito particulares, pois sofre variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis (Andrews & Hirano, 1991).

O filoplano é um ambiente complexo onde são encontrados basicamente três tipos de microrganismos: leveduras, fungos filamentosos e bactérias, que são os mais abundantes com uma população estimada em  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> de superfície foliar (Lindow & Leveau, 2002); cada grupo de microrganismos possui estratégias próprias de colonização e sobrevivência, ocupando nichos específicos. Esta colonização é importante porque esses microrganismos podem inibir a germinação de conídios e o crescimento de microrganismos fitopatogênicos (Bettiol, 1997).

Leben (1985), estudando o controle biológico no filoplano, fez menção à comunidade microbiana que é composta basicamente por microrganismos residentes e transeuntes ou casuais. A relação entre hospedeiro, patógeno e comunidade microbiana no filoplano é influenciada pelo micro-clima na superfície das folhas e pelas mudanças sazonais, propiciando uma constante variação do habitat (Bettiol, 1997; Blakeman, 1985).

Um dos principais problemas do uso de residentes de filoplano para biocontrole de fitopatógenos advém de sua baixa capacidade de sobrevivência ou mesmo de sua capacidade de manter a população em alta densidade (Andrews, 1992; Windels & Lindow, 1985). Essas bactérias utilizam basicamente três tipos de estratégias para sobreviverem em ambientes de estresse: tolerância, escape e nutrição. (Beattie & Lindow, 1995; Beattie & Lindow, 1999) A primeira alude à capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta, baixa umidade, além de outros, enquanto a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais. Na terceira instância, a nutricional, Romeiro (2007) menciona que a bactéria deve ser suficientemente versátil, do ponto de vista metabólico e nutricional, para utilizar os nutrientes disponíveis e ser capaz de competir por eles com os componentes da microbiota circundante.

Portanto, um antagonista com potencial de biocontrole deve ser capaz de se estabelecer com eficiência em locais protegidos e conseguir manter-se em condições ambientais desfavoráveis. Se este tiver um grande potencial de competição por nutrientes e capacidade em produzir substâncias antimicrobianas de amplo espectro, ficam reduzidas as chances dos propágulos de fitopatógenos sobreviverem (Bettiol, 1997) o que reduziria a chance de ocorrência de ciclos secundários da doença.

De acordo com Wilson & Lindow (1994), a capacidade de competição no filoplano é maior quando existe uma sobreposição das exigências nutricionais do antagonista e do fitopatógeno, resultando em um baixo nível de coexistência entre os dois organismos. Assim, a bactéria residente de filoplano a ser introduzida para atuar como agente de controle biológico deve ser específica e hábil em competir com o patógeno alvo por nutrientes e nichos, multiplicando-se e desenvolvendo-se nas mesmas condições ambientais ideais para a ocorrência da doença (Romeiro, 2007).

Tentativas de se utilizar residentes de filoplano como agentes de biocontrole continuam sendo realizadas, apesar de todas as características da condição inóspita do ambiente do filoplano (Bettiol, 1997). Experiências em controle biológico foram muito promissoras utilizando vários microrganismos visando o antagonismo direto, promoção de crescimento ou indução de resistência em várias culturas.

O modo de ação do antagonista relacionado ao comportamento parasítico do patógeno pode auxiliar em prever a eficiência e as perspectivas de sucesso do antagonista (Andrews, 1992). Patógenos biotróficos têm fase epífita relativamente curta e geralmente exigem pouco ou nenhum nutriente exógeno para penetração. Se o controle biológico for dirigido a esta fase do ciclo, os antagonistas que agem por antibioses produzindo substâncias antimicrobianas são os mais eficazes. Em contraste, os necrotróficos não especializados tendem a crescer saprofiticamente no filoplano, recolhendo nutrientes exógenos antes que penetrem (Andrews, 1992); é por isso que antagonistas operando como concorrentes de nutrientes poderiam ser eficazes nessa situação, embora o princípio relativo ao modo de parasitismo ofereça alguma previsibilidade para à estratégia de controle biológico.

É também conhecida a produção de algumas substâncias voláteis por antagonistas contra patógenos, sendo a mais pesquisada o ácido cianídrico (HCN), um potente inibidor de hemi-proteínas tais como a citocromo oxidase e a cloreto dismutase (Rikken *et al.*, 1996). Segundo Song & Logan (2004), o cianeto pode levar à inibição da cloreto dismutase assim como outras hemi-enzimas envolvidas na redução do

perclorato. A inibição dessas enzimas resulta em acúmulo de cloreto no interior da célula, a qual pode entrar em colapso.

A habilidade de competir por nutrientes é uma característica determinante do antagonista. Na natureza, o ferro é de importância biológica participando da cadeia transportadora de elétrons e como co-fator enzimático. Quando microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos crescem em ambientes deficientes em ferro, sintetizam agentes quelantes específicos para o íon  $Fe^{+3}$  denominados sideróforos (Varma & Chincholkar, 2007), que é uma das estratégias que os microrganismos usam para lidar com a limitação do ferro. Sideróforos são compostos de baixo peso molecular (500-1000 Daltons) produzidos por fungos e bactérias, os quais exercem a função de ligarem-se especificamente ao íon ferro, sendo posteriormente transportados para o interior da célula (Varma & Chincholkar, 2007). Assim, atuam como agentes solubilizadores extracelulares sob condições limitantes de ferro. De acordo com a estrutura, os sideróforos podem ser divididos em catecolatos, produzidos somente por bactérias e hidroxamatos, produzidos tanto por fungos quanto por bactérias. Há ainda um terceiro grupo, chamado de misto por apresentarem em uma mesma molécula ligantes hidroxamatos e fenolatos (Varma & Chincholkar, 2007). Quando produzidos em grande quantidade por antagonistas, os sideróforos indisponibilizam o elemento  $Fe^{+3}$  para o patógeno alvo (Varma & Chincholkar, 2007).

Embora se busque caracterizar o modo de ação exercido pelo antagonista, acredita-se que, na natureza, o antagonismo opere por vários mecanismos.

No Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da UFV, alguns trabalhos já foram realizados visando selecionar bactérias do filoplano para o controle de doenças de parte aérea do feijoeiro (Garcia, 2004) e do tomateiro (Halfeld-Vieira *et al.*, 2001). Entretanto, a necessidade de estudar a potencialidade e a aplicabilidade do controle biológico por residentes do filoplano em outras culturas como a couve é importante pelo fato de que grande parte da produção é feita em cultivos orgânicos, onde o componente biológico pode ter uma alta significância no controle de doenças.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolamento e preservação das bactérias do filoplano de couve

Foram coletadas folhas de couve em várias localidades da região de Viçosa, Minas Gerais, dando preferência a culturas onde não são utilizados defensivos químicos para se ter maior variabilidade de bactérias isoladas e, com isso, aumentar a possibilidade de encontrar antagonistas promissores. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e identificadas de acordo com o local da planta da qual foram retiradas.

As amostras foram processadas no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV para o isolamento de bactérias residentes do filoplano. Em um Erlenmeyer com 200mL de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada, contendo Tween 80 a 0,3%, foram acrescentados 20g de fragmentos de tecido foliar e submeteu-se a um tratamento com ultra-som por 20 min a 60 Hz (Halfeld-Vieira, 2002; Romeiro, 2001).

Após este período, para o isolamento das bactérias, adotaram-se dois procedimentos. Para o isolamento da população total de bactérias do filoplano, foram feitas diluições seriadas (fator 1:10) da suspensão original do material vegetal. Das diluições, foram semeados 100µL em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) e espalhadas com auxílio da espátula de Drigalsky. A mesma suspensão original foi reprocessada para o isolamento seletivo de bactérias esporogênicas pelo método de Földes *et al.* (2000), tendo se realizado o semeio conforme descrito no primeiro procedimento.

As placas foram mantidas em incubadora a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h para o desenvolvimento de colônias e obtenção de culturas puras. Colônias isoladas foram transferidas para meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) em tubos de ensaio, coletando-se, preferencialmente, colônias com características morfológicas e culturais diferentes (Halfeld-Vieira *et al.*, 2001; Klement *et al.*, 1990). As colônias foram preservadas utilizando a metodologia de água esterilizada. Para ficarem disponíveis no

momento dos testes, as colônias foram mantidas por repicagem periódica em tubos de ensaio contendo meio 523 (Kado & Heskett, 1970) mantidos na geladeira a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (Dhingra, 1985; Romeiro, 2001).

### **3.2. Isolamento e preservação dos microrganismos fitopatogênicos**

Os isolados de *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire (Ab) e de *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 (*Xcc*) utilizados como patógenos alvos para a seleção dos antagonistas foram isolados de plantas de couve com sintomas típicos da doença, coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foi isolada pelo método padrão e a identificação da espécie foi realizada por procedimentos descritos em Romeiro (2001) e Schaad *et al.* (2001). A produção de inóculo foi feita em meio 523 de Kado & Heskett (1970) e a preservação por armazenamento em geladeira, a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , em água esterilizada (Dhingra, 1985; Klement *et al.*, 1990; Romeiro, 2001).

A espécie *A. brassicicola* foi isolada pelo método direto (Alfenas & Gonçalves, 2007) e multiplicada em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (Tuite, 1969) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , com alternância de 12h de luz e escuro. Posteriormente, o patógeno foi armazenado em sílica-gel, utilizando leite desnatado como solução protetora (Dhingra, 1985). A confirmação da identidade foi realizada por meio da observação microscópica das estruturas (Simmons, 2007).

### **3.3. Seleção massal *in vitro***

Em uma primeira etapa de seleção, verificou-se a produção de substâncias antimicrobianas hidrossolúveis capazes de inibir o crescimento e o desenvolvimento dos patógenos alvos. Todos os isolados de bactérias residentes do filoplano foram testados pelo método de camada dupla (Romeiro, 2007; Vidaver *et al.*, 1972). Em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo uma camada de 5mL de meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) foram cultivados cinco isolados dos potenciais antagonistas em forma diametralmente equidistante. Após incubação por 24h a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , as colônias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio (1mL) adicionado na superfície interna da tampa da placa por uma hora e mais uma hora de exposição à luz ultravioleta ( $\lambda =$

254 nm). A seguir, adicionou-se a cada placa uma segunda camada de meio 523 semi-sólido fundente ( $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ) contendo propágulos de um dos patógenos desafiantes.

### **3.4. Seleção massal *in vivo* em casa de vegetação**

Esta seleção foi realizada paralelamente aos trabalhos de seleção *in vitro* visando testar a potencialidade dos antagonistas em controlar a alternariose e a podridão negra da couve. Na seleção massal *in vivo*, foram utilizadas plantas de couve tipo Manteiga com 25 dias após a emergência (DAE) e cinco folhas desenvolvidas, contidas em vasos independentes com capacidade para 500mL de mistura de solo, areia e esterco (2:1:1 v/v/v) mantidas em casa de vegetação com irrigação apenas no substrato.

As plantas foram tratadas separadamente com a atomização de 10mL de suspensão dos antagonistas. Para o preparo da suspensão dos antagonistas, colônias foram semeadas por espalhamento, em meio 523 sólido (Kado & Heskett, 1970) e incubadas por 24h a  $28^\circ\text{C}$ . Células dos antagonistas foram suspendidas em água e as concentrações foram ajustadas em espectrofotômetro ( $\text{DO}_{540 \text{ nm}} = 0,3$ ). Como controle, foram utilizadas plantas pulverizadas com oxiclureto de cobre ( $1,8 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ), conforme registro para o controle da alternariose e da podridão negra (MAPA, 2010); plantas não pulverizadas com os antagonistas, mas inoculadas com os patógenos (testemunha relativa) e plantas não pulverizadas com os antagonistas e nem inoculada com os patógenos (testemunha absoluta). Foram utilizadas quatro plantas para cada tratamento.

A suspensão de inóculo de *Xcc* foi preparada e ajustada ao espectrofotômetro ( $\text{OD}_{540 \text{ nm}} = 0,3$ ) e a de *Ab* para  $5 \times 10^4$  conídios/mL, utilizando-se câmara de Neubauer. A inoculação foi feita cinco dias após a aplicação dos tratamentos e as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24h antes da inoculação. Duas folhas opostas de cada planta foram marcadas para inocular os patógenos. Cada patógeno foi inoculado em uma folha e, para evitar contaminação, utilizou-se um anteparo de plástico entre as folhas no momento da aplicação da suspensão de inóculo. Após a inoculação, as plantas permaneceram por 24h em câmara de nevoeiro e a seguir foram transferidas para a casa de vegetação (Lelliott & Stead, 1987; Romeiro, 2001b).

A quantificação da severidade foi iniciada após 80% das plantas apresentarem sintomas típicos de cada doença. Folhas marcadas e tratadas foram digitalizadas em um escâner a 300dpi. As imagens obtidas foram processadas para a quantificação da

severidade das doenças utilizando-se o programa QUANT (Vale, 2003) com o método de redução de cores.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições em diferentes épocas. A unidade experimental foi constituída por cada folha marcada/vaso e os dados de severidade foram submetidos à análise estatística descritiva. Considerou-se a média da severidade para a seleção dos potenciais antagonistas, que foram novamente testados com maior número de repetições. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (Statistical Analysis Systems, Inc., Cary, NC).

### **3.5. Confirmação do potencial antagonístico das bactérias selecionadas**

Após a etapa de seleção massal, foram escolhidas 10 bactérias antagonistas mais promissoras para o controle de cada doença. O potencial dos antagonistas selecionados foi confirmado utilizando cinco repetições, representadas por uma planta de couve com 25 DAE em um vaso de 500mL de capacidade. Os procedimentos utilizados na aplicação dos antagonistas, inoculação dos patógenos e quantificação das doenças foram os mesmos utilizados na seleção massal das bactérias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 13 tratamentos (10 antagonistas, um tratamento químico, uma testemunha absoluta e uma relativa) para cada patógeno testado. As 20 bactérias selecionadas — 10 para o controle de cada doença — foram estudadas em relação a alguns mecanismos de antagonismo por meio de testes em laboratório.

### **3.6. Caracterização da potencialidade antagônica**

Foram realizados ensaios *in vitro* para caracterizar o antagonismo envolvido no controle da alternariose e da podridão negra da couve pelas bactérias residentes do filoplano selecionadas por meio de testes *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.6.1. Inibição do crescimento micelial de *Alternaria brassicicola* pelo método de pareamento de culturas.**

Foram utilizadas duas combinações de meios de cultura e de temperatura; meio BDA a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e meio 523 a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  para determinar qual o mais adequado para o crescimento dos microrganismos envolvidos e para maior sensibilidade do teste. De

meio de cultura em placas onde o fungo estava em crescimento ativo retirou-se assepticamente um disco de 5 mm de diâmetro, o qual foi depositado no meio de cultura da placa do ensaio, próximo da borda. Suspensão da cultura do antagonista, na fase logarítmica de crescimento foi depositada com alça de repicagem no ponto oposto de onde o disco do micélio fúngico foi colocado. Após a incubação e crescimento dos microrganismos, procedeu-se à avaliação (Barra, 2008).

### **3.6.2. Inibição *in vitro* da germinação de conídios de *Alternaria brassicicola***

Utilizou-se a técnica da lâmina escavada, onde foram misturados 35µL de suspensão da bactéria antagonista ( $OD_{540\text{ nm}} = 0,3$ ) e 35µL de suspensão de conídios do fungo ( $5 \times 10^4$  conídios/mL), seguido de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10h dentro de um gerbox. Procedeu-se à contagem de 100 conídios em três campos de cada lâmina, que foi considerada uma repetição. Conídios germinados foram considerados aqueles que apresentaram o comprimento do tubo germinativo maior que a metade da extensão do conídio. Calculou-se o índice de germinação ( $IG = CGA/CGC \times 100$ ) de cada antagonista, onde CGA = conídios germinados no antagonista e CGC = conídios germinados no controle.

### **3.6.3. Produção de compostos voláteis inespecíficos pelas bactérias antagonistas**

Foi utilizado o método de placas sobrepostas ou invertidas, conforme descrito por Barra (2008) e Romeiro (2007). Alíquotas de 100 µL das diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  das bactérias antagonistas e de *Xcc* foram semeadas e emparelhadas com as correspondentes diluições em placas de Petri com meio sólido 523 (Kado & Heskett, 1970) e incubadas por 96 h a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Foi estudada também a possível auto-inibição de *Xcc* por meio do emparelhamento de placas unicamente com o patógeno. A avaliação consistiu na inspeção de cada placa de 24 em 24h e comparação por meio de análise descritivo, com o controle (sem antagonista) de diluição equivalente. Avaliou-se o número, o tempo de surgimento e o tamanho das colônias de *Xcc*. O mesmo procedimento de placas invertidas foi realizado para testar a produção de compostos voláteis contra o fungo *Ab*. Foi depositado assepticamente um disco (0,5 cm de diâmetro) de micélio do fungo no centro da placa com meio BDA. Esta placa foi pareada com as diluições dos antagonistas semeadas em meio 523. A avaliação foi realizada aos 8 e 15 dias, sendo que a variável quantificada foi o diâmetro maior da

colônia do fungo. Posteriormente, calculou-se o Índice de Redução do Crescimento de *Ab* pelos diferentes antagonistas testados ( $IRC = (CFTA - CFC) / CFC$  onde: CFTA = crescimento médio do fungo no tratamento com o antagonista e CFC = crescimento do fungo no tratamento controle).

#### **3.6.4. Produção de amônia**

As bactérias antagonistas foram semeadas e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido e uma tira de papel de tornassol preso por uma das extremidades entre o bordo interno do tubo e o tampão de algodão. A mudança de cor do papel indicador de roxo para azulado em um prazo de três dias indicou a produção de amônia pela bactéria antagonista (Schaad *et al.*, 2001).

#### **3.6.5. Produção de ácido cianídrico (HCN)**

A produção de HCN foi determinada pela metodologia de Castric & Castric (1983). Em meio de cultura TSA semi-sólido (triptona 15g, peptona 5g, NaCl 5g e ágar 7,5 g.l<sup>-1</sup> acrescido de glicina 0,05g e FeCl<sub>3</sub> . 6H<sub>2</sub>O 0,005g.l<sup>-1</sup>) em estado semi-fundente foram adicionadas células bacterianas dos potenciais antagonistas a serem testados. Cada antagonista foi dispensado em três cavidades de placas de diluição. Sobre as placas de diluição foram depositadas duas telas de nylon e o conjunto foi colocado em placas de Petri de 150mm. Para a detecção de cianeto, utilizou-se papel de filtro embebido no reativo composto de acetoacetato de etila cobre derivativo e 4,4'-dimetileno (-N,N-dimetilanilina) na quantidade de 5 mg de cada, dissolvidos em 2ml de clorofórmio. Sobre o papel impregnado com o reativo foram depositadas duas telas de aço. O conjunto foi mantido por 72 h a 28± 1°C. Foram consideradas produtoras de HCN as bactérias antagonistas que originaram manchas de coloração marrom no papel indicador na região correspondente à posição da cultura bacteriana.

#### **3.6.6. Produção de sideróforos**

Toda a vidraria utilizada foi previamente imersa em solução sulfocrômica por 48h e enxaguada várias vezes em água destilada. Foi utilizada a metodologia de Schwyn & Neilands (1987). As bactérias a serem testadas foram cultivadas em meio King B por 48h sob agitação. Como controle, os mesmos antagonistas foram cultivados no meio

King acrescido de  $2\mu\text{M m L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{+3}$ , preparado a partir de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e esterilizado por filtração. Após o crescimento bacteriano, as células foram precipitadas por centrifugação e descartadas. O sobrenadante foi misturado em quantidades iguais de  $500\mu\text{L}$  com a solução indicadora de cromo azurol S (Castric & Castric, 1983), a qual foi preparada pela mistura de  $6\text{mL}$  de solução de hexadecil-trimetilamônio (HDTMA)  $10\text{mM}$  e  $5\text{mL}$  de água. Foram acrescentados sob agitação,  $1,5\text{ mL}$  de solução férrica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $1\text{ mM}$  preparada em  $\text{HCl}$   $0,01\text{N}$ ) e  $7,5\text{ ml}$  de solução de cromo azurol S  $2\text{mM}$ . Paralelamente, em outro recipiente, foram dissolvidos  $4,31\text{g}$  de piperazina anidra em  $20\text{ml}$  de água acrescida de  $6,25\text{ml}$  de  $\text{HCl}$ , depois de dissolvida. Essa solução foi adicionada ao restante dos preparados e o volume completado para  $100\text{mL}$ . A mudança de cor do sobrenadante após a adição da solução indicadora de azul para amarelo-avermelhado num prazo de  $15\text{ min}$  foi interpretada como produção de sideróforos pela bactéria antagonista testada.

### **3.7. Compatibilidade dos antagonistas promissores**

Um antagonista foi selecionado como o mais promissor para o controle de cada doença dentre os 20 selecionados inicialmente. Foi testada a compatibilidade entre os mesmos pela metodologia de De Boer (1999). Os dois antagonistas foram semeados, por ponto, em 10 placas com meio 523 em seguida foram incubados por 48h. Células bacterianas de cada antagonista foram suspensas em salina acrescida de Tween 80 ( $0,05\text{ml.l}^{-1}$ ) e ajustada a  $\text{OD}_{540\text{nm}} = 0,3$ . As suspensões foram aplicadas por pulverização na superfície de 5 placas onde cresciam os antagonistas. As placas foram mantidas por 24h incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  até a avaliação da formação ou não de halo de inibição de crescimento.

A utilização conjunta dos dois antagonistas no controle das duas doenças foi testada em plantas de couve. Foram utilizados quatro tratamentos com três repetições: plantas pulverizadas com água, plantas pulverizadas com as suspensões dos dois antagonistas em separado e plantas pulverizadas com a mistura (1:1) dos dois antagonistas, após o ajuste da concentração em espectrofotômetro ( $\text{OD}_{540\text{ nm}} = 0,3$ ). As plantas, após a inoculação, foram mantidas em casa de vegetação até a avaliação.

Quantificou-se a severidade das doenças em cada tratamento e as médias dos dados foram submetidas a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Isolamento

Obtiveram-se 324 isolados de bactérias do filoplano de couve, das quais 112 eram de bactérias produtoras de pigmentos fluorescentes, 68 bactérias formadoras de endósporo e 144 de outras bactérias. As culturas, após codificação, foram armazenadas no Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

### 4.2. Seleção massal *in vitro*

Caracterizaram-se os isolados em função da presença e tamanho do halo de inibição formado pela difusão de substâncias antimicrobianas hidrossolúveis no meio de cultura (Tabela 1). Dentre os 324 isolados avaliados, 57 foram capazes de inibir o crescimento de *Ab* e 47 de *Xcc*, enquanto doze inibiram ambos os patógenos. Aproximadamente 85% dos isolados não produziram qualquer composto antimicrobiano detectável por difusão no meio de cultura. A amplitude de halos formados foi de 1,3 a 7,1cm de diâmetro e apenas três isolados formaram o halo de maior diâmetro.

Tabela 1. Diâmetro do halo de inibição produzido pelas bactérias isoladas do filaplano de couve contra *Alternaria brassicicola* (*Ab*) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*).

Diâmetro do halo de inibição	Frequência do número de isolados contra <i>Ab</i>	Frequência do número de isolados contra <i>Xcc</i>
0,0	267	277
1,3 - 3,9	1	1
4,0 - 4,9	51	41
5,0 - 6,9	2	2
7,0 - 7,1	3	3
Total	324	324

### **4.3. Seleção massal *in vivo***

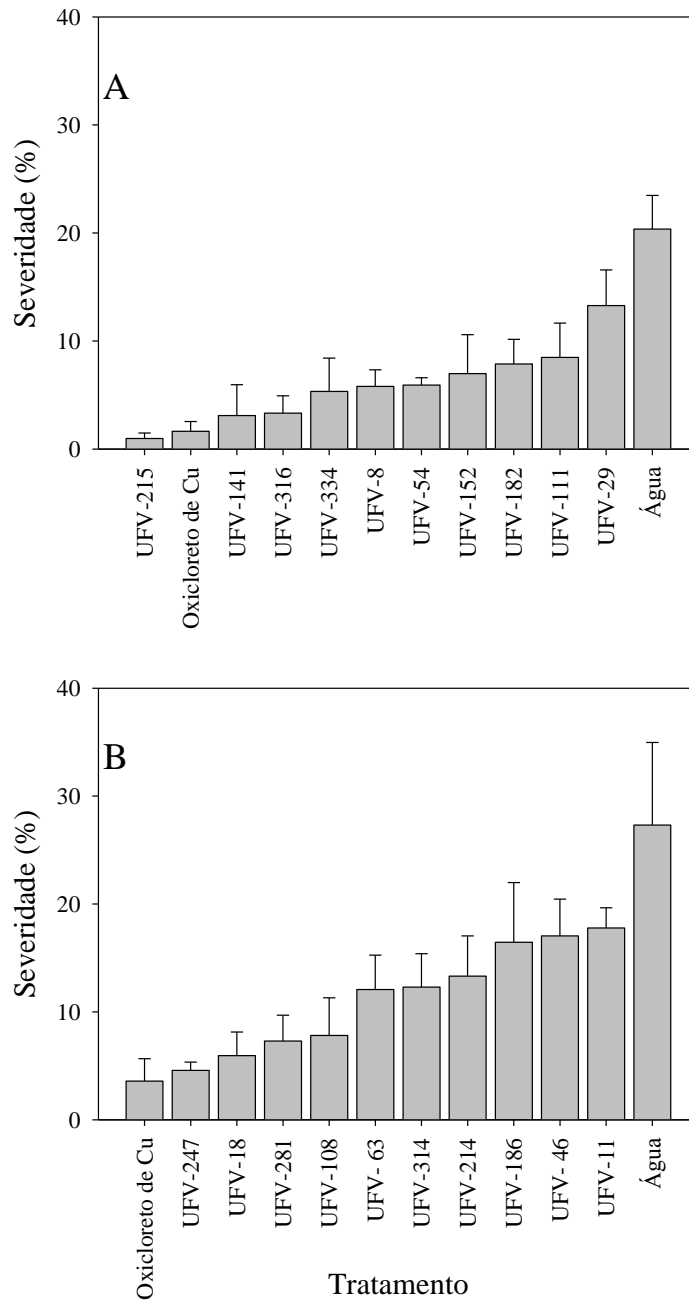
A severidade máxima encontrada no experimento da podridão negra foi de 32% e de alternariose de 26%. Dentre os 324 isolados avaliados a maioria reduziu a severidade significativamente (38%) e os isolados com maior redução da severidade da doença foram selecionados para o próximo experimento de confirmação da potencialidade. A severidade de ambas as doenças nas folhas tratadas com esses isolados variou entre 0,5 e 5,0%.

Os isolados selecionados para a segunda etapa da seleção foram: UFV-8, UFV-29, UFV-54, UFV-111, UFV-141, UFV-152, UFV-182, UFV-215, UFV-316 e UFV-334 contra a alternariose e UFV-11, UFV-18, UFV-46 UFV-63, UFV-108, UFV-186, UFV-214, UFV-247, UFV-281, UFV-314 contra a podridão negra.

### **4.4. Confirmação do potencial antagonístico das bactérias selecionadas**

O tratamento com o oxiclreto de cobre reduziu a severidade da alternarise e podridão negra das brássicas. A bactéria isolada do filoplano UFV-215 destacou-se no controle da alternariose (Figura 2). Este isolado reduziu em 95% a severidade da doença, apresentando o mesmo nível de controle que o oxiclreto de cobre. Os isolados UFV-141 e UFV-316 diminuíram a severidade, suprimindo a doença em 85%. Com exceção do isolado UFV-29 que reduziu a severidade em 35%, todos os outros isolados reduziram a severidade da doença acima de 50%.

A severidade da podridão negra (Figura 2) foi reduzida significativamente ( $P \geq 0,05$ ) pelo isolado UFV-247, comparado com o controle (água), sendo selecionado como o mais promissor para o controle da doença. Os demais isolados avaliados diminuíram a severidade da doença entre 71 e 51%, com exceção dos isolados UFV-11 (35%), UFV-46 (37,6%) e UFV-186 (39%).



**Figura 2:** Severidade da alternariose (A) e da podridão negra (B) em folhas de couve tratadas com bactérias isoladas do filoplano, oxicloreto de cobre e água. As barras representam o erro padrão da média.

#### **4.5. Caracterização dos potenciais antagonistas em ensaios laboratoriais**

Os ensaios realizados permitiram caracterizar as bactérias selecionadas para o controle da alternariose e da podridão negra da couve.

##### **4.5.1. Inibição do crescimento micelial de *Alternaria brassicicola* pelo método de pareamento de culturas**

A inibição do crescimento micelial de *Ab* foi maior para os isolados UFV-111, UFV-152, UFV-182, UFV-334 e menor para os isolados UFV-29, UFV-141 e UFV-316. Nestes últimos, a inibição ocorreu por um curto período de tempo sendo o efeito inibitório pouco durável comparado com os outros isolados. Os isolados UFV-8 e UFV-215 não inibiram o crescimento micelial. Com respeito à avaliação do meio de cultura e da temperatura que permitiriam um melhor desenvolvimento e sensibilidade de ambos os microrganismos, verificou-se que o meio BDA (Tuite, 1969) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  foi o binômio mais eficiente. Destacou-se a inadequação de utilização, para esse teste, do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , que desfavoreceu o patógeno *Ab*.

##### **4.5.2. Inibição *in vitro* da germinação de conídios de *Alternaria brassicicola***

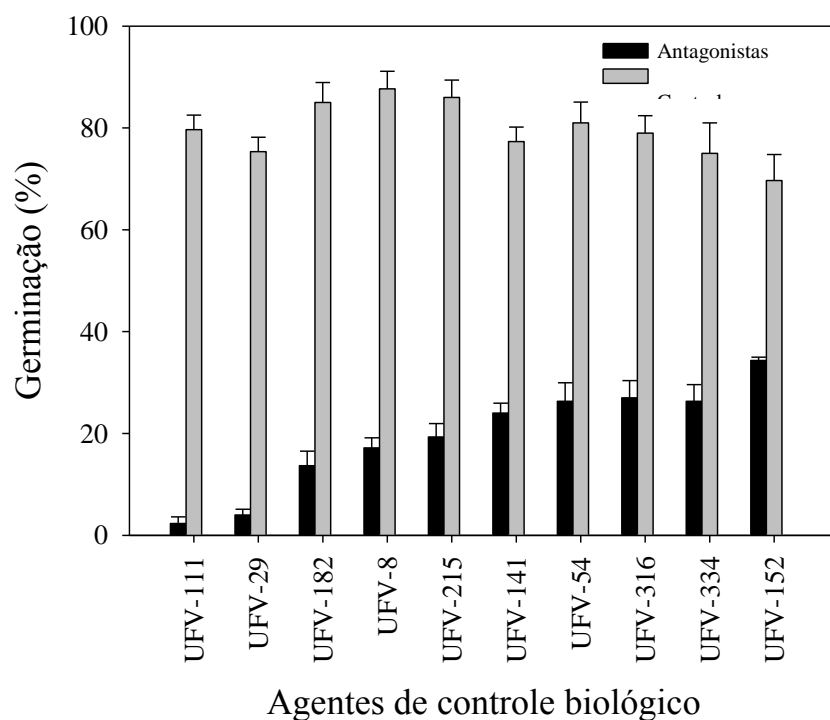
A habilidade de inibir a germinação de conídios de *A. brassicicola* (Figura 3), foi comum para os agentes de biocontrole testados. A inibição da germinação variou de 97,1 a 50,7%. Vale ressaltar que os isolados UFV-111 e UFV-29 foram os mais eficientes na inibição, permitindo apenas um índice de germinação de conídios de 2,9 e de 5,3%, respectivamente, em relação ao controle.

##### **4.5.3. Produção de amônia (NH<sub>3</sub>) e outros compostos voláteis inespecíficos**

Onze isolados produziram amônia (Tabela 2). Os isolados UFV-111, UFV-215, UFV-316, UFV-46 e UFV-214 apresentaram maior eficiência em produzir amônia, pois demandaram menor tempo para virar a cor do indicador.

Compostos voláteis inespecíficos sintetizados pelos antagonistas nas diluições  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  retardaram o surgimento e reduzir o número de colônias de *Xcc* (Figura 4). O isolado UFV-214 foi o único que retardou por 48h o surgimento de colônias de *Xcc*, sendo estas de tamanho menor e de aspecto anormal quando comparadas às colônias

formadas na placa testemunha no mesmo período. Isolados como UFV-247, UFV-186, UFV-63 e UFV-18 foram capazes de reduzir o número de colônias do patógeno, mas não foi consistente e as colônias aumentaram nas nos tempos de avaliação subsequentes. Após 72h de avaliação, os isolados UFV-215, UFV-247 e UFV-63 apresentaram maiores evidências de produção de compostos voláteis inespecíficos, mantendo o número de colônias de *Xcc* significativamente menor que o controle. Para os antagonistas testados contra *Ab*, evidenciou-se também a produção de compostos voláteis, pois em todos os isolados, nos dois tempos de avaliação, o crescimento do fungo foi menor que o observado para o tratamento controle (Figura 5). O IRC dos antagonistas testados variou de 26 a 71%. Os antagonistas UFV-334, UFV-316, UFV-182 e UFV-141 foram os que permitiram menor crescimento do patógeno, que apresentou o IRC= 71, 61, 57 e 53%, respectivamente.

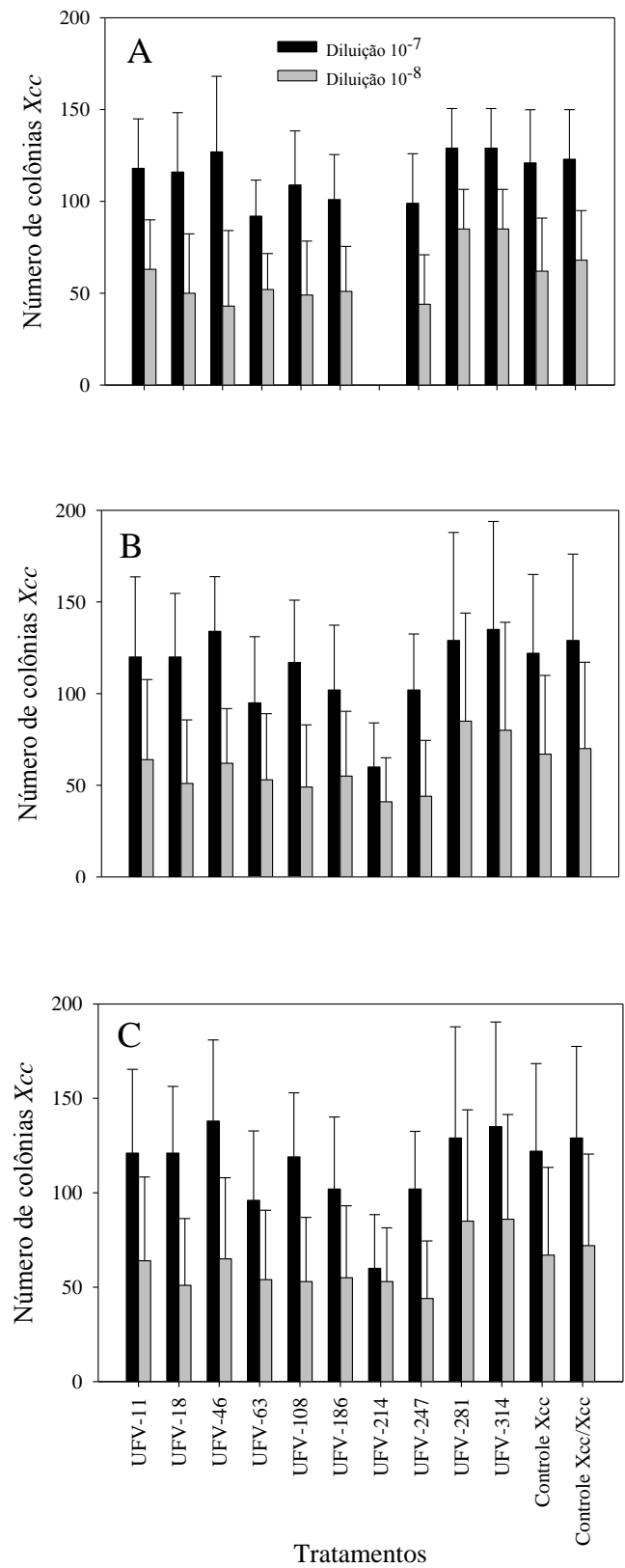


**Figura 3:** Germinação de conídios de *Alternaria brassicicola* tratados com suspensões de bactérias isolados do filoplano de couve. As barras representam o erro padrão da média.

#### 4.5.4. Produção de ácido cianídrico (HCN)

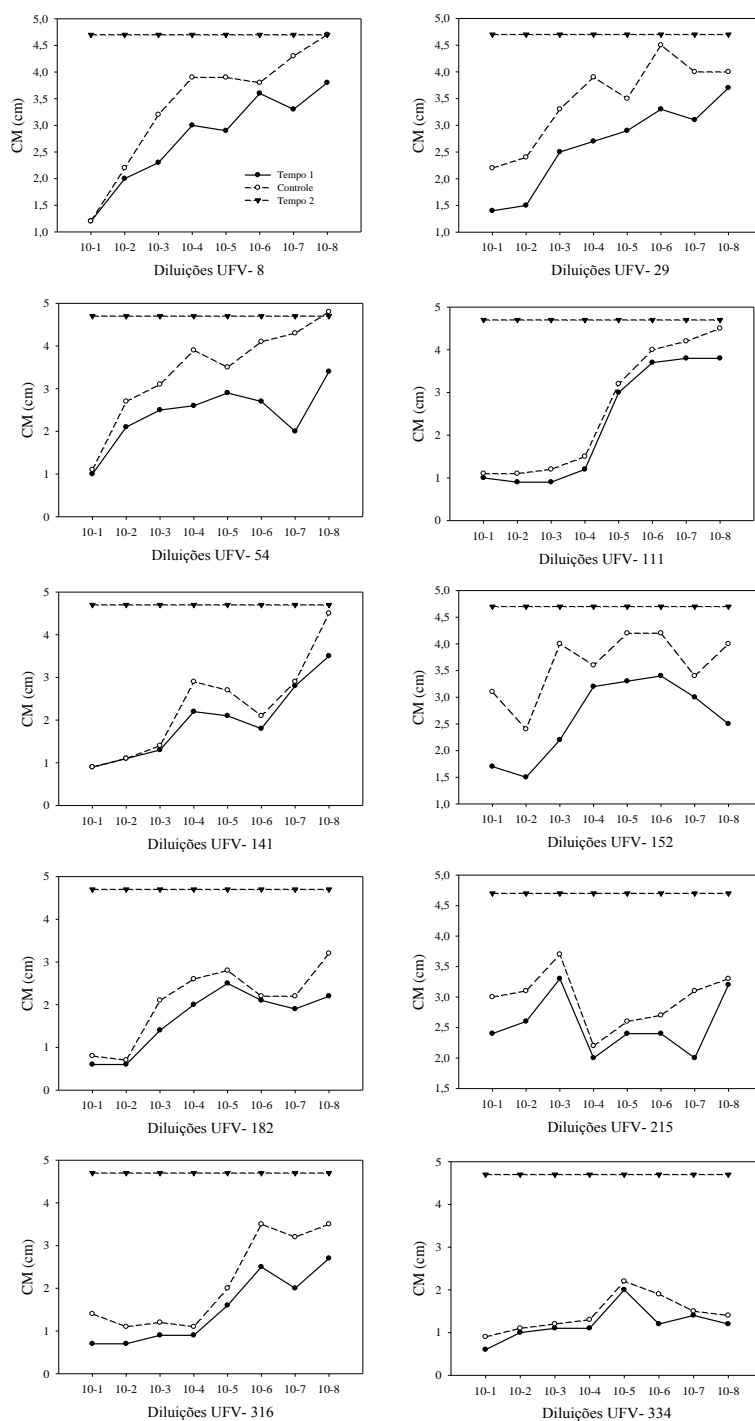
Foi detectada a produção de HCN por 10 isolados (Tabela 2) dentre os 20 testados. A intensidade das manchas de coloração marrom no papel indicador foi maior

para os isolados UFV-46, UFV-11 e UFV-18 e foram evidenciadas desde as primeiras 48 h quando comparados com os outros isolados antagonistas testados.



**Figura 4:** Número de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* após 24 (A) 48 (B)

e 72 horas (C) de exposição a compostos voláteis produzidos por bactérias isoladas do filoplano de couve. As barras representam o erro padrão da média.



**Figura 5:** Crescimento micelial de *Alternaria brassicicola* aos oito (Tempo 1) e quinze dias (Tempo 2) de exposição a possíveis compostos voláteis produzidos por bactérias isoladas do filoplano de couve.

#### 4.5.5. Detecção de sideróforos

Apenas os isolados UFV-108, UFV-215, UFV-247 e UFV-334 produziram sideróforos (Tabela 2).

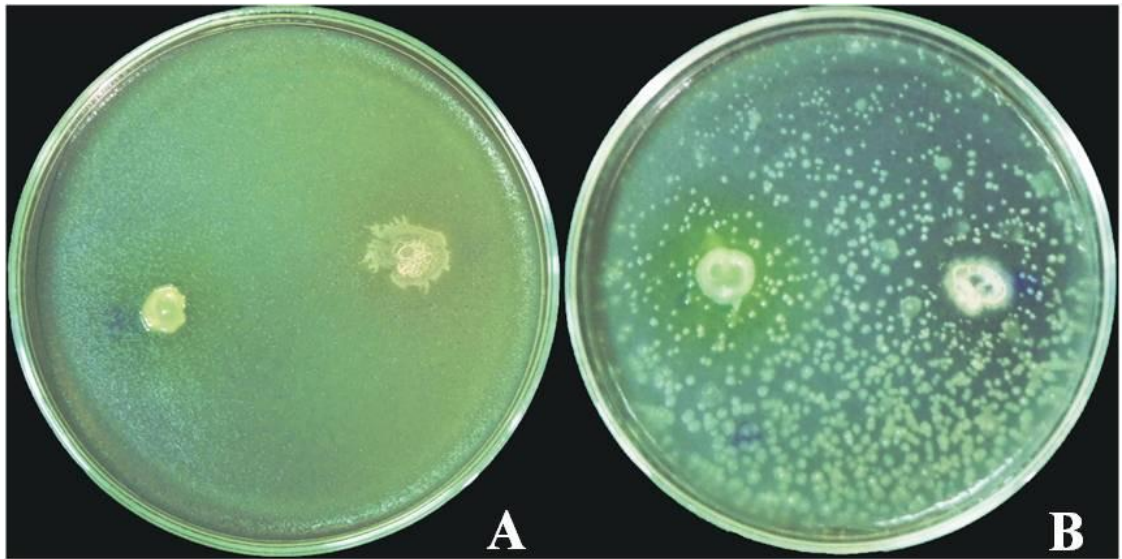
#### 4.6. Compatibilidade dos antagonistas promissores:

Em teste de compatibilidade realizado *in vitro* entre os isolados UFV-215 e o isolado UFV-247, não foi detectada a produção de substâncias hidrossolúveis que pudessem inibir o crescimento desses isolados (Figura 6). A utilização da mistura dos antagonistas (Mix), reduziu significativamente a severidade da alternariose e da podridão negra da couve (Figura 7).

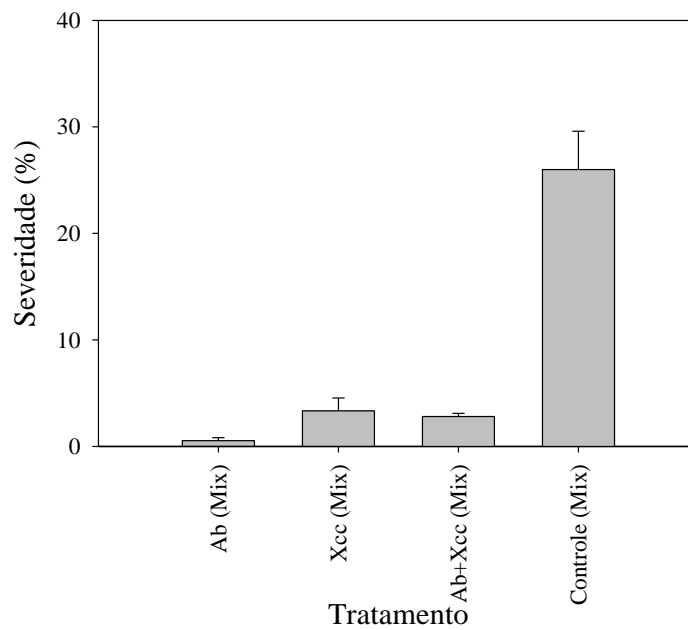
**Tabela 2.** Caracterização da potencialidade antagonista e biocontrole experimental contra *Ab* e *Xcc* dos agentes bacterianos isolados do filoplano da couve.

Antagonistas Testados	Antibiose		Inibição da germinação	Produção de			Sideróforos	Biocontrole experimental
	Dupla camada	Pareamento de culturas		Voláteis	Amônia	HCN		
								<i>Xcc</i>
UFV-11	-	ne	ne	-	-	++	-	-
UFV-18	-	ne	ne	+	-	+	-	+
UFV-46	-	ne	ne	+	++	++	-	-
UFV-63	++	ne	ne	+	-	++	-	-
UFV-108	-	ne	ne	-	+	+	+	+
UFV-186	-	ne	ne	+	-	-	-	-
UFV-214	-	ne	ne	++	++	-	-	-
UFV-247	-	ne	ne	+	+	-	+	++
UFV-281	+	ne	ne	-	-	-	-	+
UFV-314	-	ne	ne	-	-	+	-	-
								<i>Ab</i>
UFV-8	-	-	-	+	-	++	-	+
UFV-29	+	+	++	+	-	+	-	-
UFV-54	+	+	-	+	+	+	-	+
UFV-111	++	++	++	+	++	-	-	-
UFV-141	+	+	-	++	-	-	-	+
UFV-152	-	++	-	+	+	-	-	+
UFV-182	-	++	+	++	-	-	-	+
UFV-215	-	-	+	+	++	+	+	++
UFV-316	+	+	-	++	++	-	-	+
UFV-334	-	++	-	++	-	-	+	+

+ = resultado positivo    - = resultado negativo    ++ = maior intensidade    ne = não efetuado



**Figura 6:** Teste de compatibilidade entre os antagonistas UFV-215 e UFV-247 selecionados como agentes de controle biológico de doenças da couve. UFV-215 seguido do semente de UFV-247 (A) e UFV-247 seguido do semente de UFV-215.



**Figura 7:** Controle experimental da alternariose e da podridão negra após a dispensa de mistura dos isolados UFV-215 e UFV-247

## 5. DISCUSSÃO

Para assegurar a expansão da produção orgânica de brássicas no Brasil, é necessário validar métodos de controle biológicos mais sustentáveis e menos dependentes do uso de produtos fitossanitários para o manejo da alternariose e podridão negra. Bactérias do filoplano são empregadas neste contexto (Romeiro, 2007a).

No presente experimento, das 324 bactérias isoladas por dois métodos, 20 isolados, aproximadamente 6%, foram selecionados como agentes de controle biológico da alternariose e podridão negra. Outros trabalhos de seleção de agentes de controle biológico destacaram a obtenção de bactérias benéficas entre 1 a 5% com rizobactérias (Kloepper *et al.*, 1980) e residentes ou endófitas (Van Toor *et al.*, 2005). A proporção no presente estudo foi maior que a obtida por Halfeld-Vieira (2004), que selecionou 2% dos residentes do filoplano do tomateiro. Utilizando métodos de isolamento padronizados, aproximadamente 2% de 500 isolados testados foram de bactérias antagonistas a doenças bacterianas e fúngicas da parte aérea de feijoeiro (Vieira Jr., 2005). Os procedimentos empregados para a seleção de isolados potencialmente eficientes para o biocontrole de alternariose e podridão negra foram adequados, uma vez que mesmo partindo de número menor de isolados, obteve-se número satisfatório de antagonistas. Entretanto, comparações diretas podem não ser adequadas, pois os sistemas avaliados são diferentes e envolvem patógenos e antagonistas com características distintas.

A obtenção de isolados de procariotas residentes do filoplano eficientes no controle biológico da alternariose e da podridão negra foi bem sucedida. Além da adequabilidade da metodologia, o fato de se ter isolado procariotas no mesmo nicho onde as doenças ocorrem pode ter contribuído para a obtenção de agentes promissores. Adicionalmente, a prospecção de bactérias residentes do filoplano em cultivos que não receberam tratamento com agroquímicos e, portanto, com maior diversidade de microrganismos, aumenta-se a possibilidade de se encontrar potenciais agentes de biocontrole.

A compreensão dos mecanismos de ação dos agentes de controle biológico conhecidas como competição, parasitismo/predação e antibiose é fundamental para selecionar os métodos e aumentar a eficiência de uso do controle biológico (Fravel, 1996). Neste sentido, uma característica importante, mas não a única, a se considerar de um potencial agente de controle biológico é a capacidade de produzir substâncias orgânicas deletérias em baixas concentrações ao crescimento ou atividades metabólicas de outros microrganismos (Baker & Cook, 1974; Fravel, 1996; Romeiro, 2007a). No presente estudo, 57 e 47 isolados bacterianos inibiram o crescimento de *Ab* e de *Xcc*, respectivamente. Entretanto, aproximadamente 85% não produziram composto antimicrobiano detectável. Cao *et al.* (2004), trabalhando com seleção de endófitas de tomateiro, conseguiram em 21% de isolados produtores de metabólitos antibacterianos e 41% de metabólitos antifúngicos. Pode-se concluir que apenas alguns dos isolados do filoplano de couve parecem atuar por antibiose e, provavelmente, o controle biológico exercido se deve ao envolvimento de mais de um mecanismo. Entretanto, os procedimentos empregados no presente estudo não permitem conclusões seguras sobre a contribuição da antibiose, pois é necessária a utilização de meios de cultura mais complexos para a detecção de outros possíveis compostos envolvidos. Antibióticos são facilmente detectáveis *in vitro*, mas no filoplano as condições ambientais favoráveis à produção dessas substâncias podem não ocorrer. Portanto, um antagonista selecionado *in vitro* para a produção de substâncias antimicrobianas pode não o ser em campo, pois o filoplano é considerado um ambiente hostil e inóspito (Andrews & Hirano, 1991). Selecionar antagonistas somente pela capacidade de produção de substâncias antibióticas pode não ser suficiente, sendo necessários estudos de outros mecanismos.

A avaliação *in vitro* baseada na antibiose é frequentemente usada para selecionar potenciais antagonistas, apesar de nem sempre haver relação com o controle biológico *in vivo* (Fravel, 1996; Levy & Carmeli, 1995). A análise dos resultados obtidos na seleção massal *in vitro* e *in vivo* mostram que não há correlação entre antibiose e efetividade de controle de doenças. Apenas seis isolados dentre os 20 selecionados nos ensaios em casa de vegetação foram produtores de substâncias antimicrobianas e nenhum deles se destacou na redução da severidade das doenças estudadas. Isto mostra que a seleção massal, utilizando-se apenas a antibiose *in vitro*, é inadequada para a seleção de potenciais agentes de biocontrole. Ressalta-se, entretanto, a sua utilidade na caracterização do modo de antagonismo exercido pelos antagonistas.

Todos os isolados selecionados na primeira seleção massal foram eficazes na re-testagem. Nas condições do experimento em casa de vegetação, o isolado UFV-215 destacou-se no controle da alternariose e o isolado UFV-247 foi o mais promissor no controle da podridão negra. Nenhum isolado selecionado reduziu a severidade das duas doenças. Isso pode ser decorrente das diferenças, tanto dos mecanismos de parasitismo dos patógenos, quanto dos mecanismos de antagonismo dos agentes de biocontrole.

Mesmo encontrando isolados promissores em casa de vegetação, é imprescindível a realização de ensaios em campo (Andrews & Hirano, 1992; Romeiro, 2007). As particularidades do filoplano com as características anatômicas e fisiológicas da superfície foliar (Costa *et al.*, 2006) e o ambiente físico-químico (Andrews & Hirano, 1991; Jacobs & Sundin, 2001) influenciam a densidade e a diversidade de microrganismos que o habitam. Durante os experimentos em casa de vegetação, a temperatura média foi 24°C, mínima de 15°C e máxima de 33°C. Para que os ensaios de campo sejam realizados, há necessidade de se conhecer melhor os antagonistas em aspectos tais como ecologia, compatibilidade com agroquímicos e outros mecanismos de antagonismo envolvidos.

Caracterizar agentes de controle biológico tentando verificar o tipo de antagonismo exercido é primordial para pesquisas mais detalhadas em controle biológico ou para desenvolvimento de produtos biológicos (Andrews, 1992; Barra, 2008). Nem todos os mecanismos de ação dos residentes do filoplano são elucidados, mas existem evidências de atuarem produzindo substâncias voláteis, competição, produção e liberação de substâncias antimicrobianas, sideróforos, enzimas ou por induzir resistência no hospedeiro (Baker & Cook, 1974; Halfeld-Vieira, 2006; Romeiro, 2007a). Onze isolados foram capazes de produzir amônia, composto volátil inespecífico que foi sintetizado pelo antagonista UFV-215 e que foi capaz de retardar por 48h o surgimento de colônias de *Xcc*. Também foram produtores os isolados UFV-247, UFV-186, UFV-63 e UFV-18. Após 72h do experimento, os isolados UFV-215, UFV-247 e UFV-63 foram consistentes quanto à produção de compostos voláteis inespecíficos como mecanismo de antagonismo no controle biológico de *Xcc* e os isolados UFV-334, UFV-316, UFV-182 e UFV-141 contra *Ab*.

Compostos voláteis podem desempenhar papel importante na inibição da atividade fúngica e bacteriana limitando a produção de propágulos e reduzindo a severidade de doenças ao afetar o desenvolvimento do patógeno. Segundo Fravel (1996), o papel da antibiose mediada por substâncias voláteis no controle biológico tem

recebido menor atenção que antibiose mediada pela produção de substâncias não voláteis. Em um dos primeiros relatos sobre a identificação e utilização de antifúngicos e bacterianos voláteis orgânicos no controle biológico foram identificados o benzothiazole, cyclohexanol, n-decanal, dimethyl trisulfide, 2-ethyl 1-hexanol e nonanal para essa atividade (Fernando *et al.*, 2005). Alguns grupos de bactérias como as *Alcaligenaceae*, *Bacillales*, *Micrococcaceae*, *Rhizobiaceae* e *Xanthomonadaceae* foram identificadas por análises filogenéticas como produtoras de compostos voláteis importantes na fungistase do solo (Zou *et al.*, 2007). Evidentemente, os dados *in vitro* e as observações indicaram que um dos mecanismos de inibição foi à produção de voláteis inespecíficos por alguns isolados selecionados. Mesmo não identificadas, as substâncias voláteis devem ser consideradas responsáveis pela ação do isolado UFV-247 pelo fato de estar correlacionado com o controle experimental da podridão negra. Outros isolados como o UFV-214 também produzem compostos voláteis, mas sem correlação com o controle das doenças *in vivo*, fato inerente porque poderia ser uma habilidade de sobrevivência no filoplano o determinante do sucesso.

Existem poucas pesquisas sobre compostos voláteis produzidos por microrganismos contra fitopatógenos (Campos *et al.*, 2010), mas sabe-se que emissão de compostos voláteis produzidos por bactérias e fungos é estudado há muito tempo e que algumas funções desenvolvidas são: sinais de comunicação entre células, promoção de crescimento (Ryu *et al.*, 2003) ou inibição de outros microrganismos. Fato que proporciona uma potencialidade a um agente de controle biológico para reduzir doenças por esse mecanismo de antagonismo. Também os antagonistas bacterianos inibem o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos por vários mecanismos como a secreção de enzimas líticas, sideróforos e antibiótico (Kai *et al.*, 2009).

A produção de HCN foi detectada em vários isolados, mas não houve correlação com a redução de doenças em casas de vegetação. Os isolados UFV-18 e UFV-215 produziram este composto volátil e reduziram a severidade das doenças testadas. Porém, os isolados UFV-247 e UFV-141 não produziram HCN e foram efetivos. Outros antagonistas como o UFV-46, UFV-11 e UFV-18 produziram com maior rapidez e maior intensidade, mas nem todos controlaram eficientemente as doenças, demonstrando que talvez este mecanismo de ação seja complementar a outros mecanismos. Um exemplo é o do isolado UFV-215, para o qual há evidências do envolvimento de outros mecanismos e supressão da alternariose.

A habilidade de sequestrar ferro proporciona vantagem competitiva para os microrganismos. A competição por íons ferro é mais importante em ambientes onde o elemento encontra-se em baixa disponibilidade, ou quando o mesmo está em sua forma reduzida. Os isolados UFV-108, UFV-247, UFV-215 e UFV-334 produziram sideróforos e potencialmente apresentariam vantagem competitiva para suprimir patógenos.

A grande quantidade de antagonistas selecionados nas pesquisas abre a possibilidade de serem empregadas em forma combinada para a qual é necessária estudar a compatibilidade e, desta forma, procurar aumentar ainda mais a eficiência do controle biológico. No teste de compatibilidade realizado *in vitro* entre os isolados UFV-215 e UFV-247 não foram detectados nenhuma produção de substância difundida no meio de cultura capaz de inibir o crescimento do outro. Portanto, a utilização deles em forma combinada para o controle tanto da podridão negra quanto da alternariose é viável. A ausência de incompatibilidade biológica é, de acordo com De Boer (1990), uma importante qualidade dos agentes co-inoculados e, portanto, um requisito considerado fundamental para o sucesso do controle biológico. Em ensaios nos quais se utilizaram a mistura dos antagonistas UFV- 247 e UFV-215, a severidade da alternariose e da podridão negra foi menor. Assume-se que não houve incompatibilidade entre isolados dos agentes de biocontrole e que ambos atuaram de forma antagônica contra as doenças.

Compatibilidade de potenciais agentes de biocontrole com agroquímicos permitidos na produção orgânica seria uma forma de validar ainda mais o controle biológico no contexto do manejo integrado de doenças. Considerando que esta preconiza estabilidade da produção, qualidade dos produtos agrícolas, menor agressão ao meio ambiente e conservação de áreas agricultáveis, o controle biológico é um componente importante no equilíbrio das estratégias para o controle de doenças de plantas.

Os antagonistas selecionados apresentam grande potencial para serem empregados como agentes de controle biológico da alternariose e podridão negra da couve. Destacam-se os isolados UFV- 247 e UFV-215 no controle das doenças *in vivo* potenciando a utilização delas em programas de manejo integrado de doenças em couve.

## 6. CONCLUSÕES

- Bactérias isoladas do filoplano de couve reduziram a severidade da alternariose e da podridão negra da couve
- Isolados selecionados como promissores apresentam mecanismos de antagonismo diferentes para controlar a alternariose e a podridão negra
- O isolado UFV-215 foi o mais promissor para o controle da alternariose e o isolado UFV-247 para o controle da podridão negra da couve
- Houve compatibilidade entre os isolados UFV-247 e UFV-215 e a aplicação combinada desses foi eficiente para reduzir a severidade da alternariose e da podridão negra da couve
- Os dois isolados selecionados têm potencialidade para o controle da alternariose e da podridão negra da couve

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A., Gonçalves, R. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- Andrews, J. H., “Biological control in the phyllosphere.” **In: Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 603-635. 1992.
- Andrews, J. H.; Hirano, S. S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1991. 501 p.
- Assis S. M. P., Silveira, E. B., Mariano, R. L., Menezes, D.. “Endophytic bacteria - method for isolation and antagonistic potential against cabbage black rot.” **In: Summa Phytopathologica**, 24(3/4). p. 216-220, 1998.
- Assis, S. M. P., Mariano, R. D., Reis, A., Silveira, E. B., Michereff, S. J.. “Rhizobacteria influencing radish growth and biological control of black rot and anthracnose.” **In: Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 38. p. 843-850, 1995.
- Assis, S. M. P., Mariano, R. L., Michereff, S. J., Silva, G., Maranhao, E. A. “Antagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field.” **In: Revista de Microbiologia** 30 (3). p. 191-195. 1999.
- Azevêdo, S. S., Michereff, S. J., Mariano, R. L. R. “Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para quantificação dessas doenças.” **In: Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 299-306, 2000.
- Babadoost, M., Gabrielson, R. L., Olson, S. A., Mulanax, M. W. “Control of *Alternaria* diseases of brassica seed crops caused by *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* with ground and aerial fungicide applications.” **In: Seed Science and Technology**, v. 21, p. 1-7, 1993.
- Baker, K. F., Cook, R. J. **Biological control of plant pathogens**. São Francisco: W.H. Freeman, 1974
- Barra, R. R.; Ferraz, H.M.F.; Macagnan, D; Silva, H. S.; Moura, A. B.; Halfeld-Vieira, B; Mendonça, H; Vieira Júnior, J. R. “Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas.” **In: Summa Phytopathologica** v. 34, 2008, p. 121-126.

- Beattie, G. A., Lindow, S. E.,. “The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves.”  
In: **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.
- Bettiol, W. E. M., M. A. B. (Eds.) **Biocontrole de doenças no Brasil: uso e perspectivas**. São Paulo: EMBRAPA, 2009. 336 p.
- Bettiol, W.. “Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas.” In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5. p. 59 - 97. 1997.
- Blakeman, J. P. “Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control.” In: Windels, C. E., Lindow, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS press, 1985. 169p. 1985.
- Campos, V. P., de Pinho, R. S. C., Freire, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciencia e Agrotecnologia**, v.34, p.525-535, 2010.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.425-430, 2004.
- Castric, K. F., Castric, P. A. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.701-702, 1983.
- Chen, L. Y., Price, T. V., Park-Ng, Z. Conidial dispersal by *Alternaria brassicicola* on chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) in the field and under simulated conditions. **Plant Pathology**, v.52, p.536-545, 2003.
- de Boer, M., van der Sluis, I., van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.201-210, 1999.
- Dehestani, A., Kazemitabar, K., Ahmadian, G., Jelodar, N. B., Salmanian, A. H., Seyedi, M., Rahimian, H., Ghasemi, S. Chitinolytic and antifungal activity of a *Bacillus pumilus* chitinase expressed in Arabidopsis. **Biotechnology Letters**, v.32, p.539-546, 2010.
- Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 355p.
- Dillard, H. R., Cobb, A. C., Lamboy, J. S. Transmission of *Alternaria brassicicola* to cabbage by flea beetles (*Phyllotreta cruciferae*). **Plant Disease**, v.82, p.153-157, 1998.

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Agricultural Database. <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>. Acesso em 10 de Outubro de 2010.
- Fernando, W. G .D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., Savchuk, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.955-964, 2005.
- Filgueira, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UFV. 2008, 421p.
- Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J. Isolation of Bacillus strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.840-846, 2000.
- Fravel, D. R. Interaction of biocontrol fungi with sublethal rates of metham sodium for control of *Verticillium dahliae*. **Crop Protection**, v.15, p.115-119, 1996.
- Fukaya, M., Miyagawa T., Koide H., Ohno, T. Study on control of black rot of cabbage. **Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center**, v.20, p.245-251, 1988.
- Garcia, F.A.O. Efetividade de Formulações de procariotas residentes de filoplano no controle biológico de doenças do tomateiro. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação de Mestrado, 2004.
- Halfeld-Vieira, B. A. Bactéria residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado, 2002.
- Halfeld-Vieira, B. A., Romeiro, R. S., Garcia, F. A. O., Mizubuti, E. S. G. Seleção de bactérias de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole para três patógenos foliares. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.488, 2001.
- 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, n.6, p.638-643, 2004.
- Halfeld-Vieira, B. A., Vieira Júnior, J. R., Romeiro, R. S., Alves Silva, H. S., Baracat-Pereira, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesq. Agropec. Bras**, v.41, p.1247-1252, 2006.
- Huang, R. G., Levy, Y. Characterization of Iprodione-resistant isolates of *Alternaria brassicicola*. **Plant Disease**, v.79, p.828-833, 1995.

- Humphersonjones, F. M., Phelps, K. Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. **Annals of Applied Biology**, v.114, p.449-458, 1989.
- Iacomi-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataille-Simoneau, N., Laurent, E., Guenard, M., Simoneau, P. In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. **Crop Protection**, v.23, p.481-488, 2004.
- 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.
- Janse, J. D. **Phytobacteriology: principles and practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. 366 p.
- Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 - 979, 1970.
- Kai, M., Hausteiner, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., Piechulla, B. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.1001-1012, 2009.
- Kinkel, L. L. Microbial population dynamics on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.
- Kinkel, L. L., Wilson, M., Lindow, S. E. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3413-3423, 1996.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 569p.
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., Miller, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas* spp. on potato plant development and yield. **Phytopathology**, v.70, p.1078-1082, 1980.
- Leben, C. "Introductory remarks: Biological control strategies in the phylloplane." In: Windels, C.E.; Lindow, S.E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS press, 1985. 169p.
- Leifert, C., Sigee, D. C., Epton, H. A. S., Stanley, R., Knight, C. Isolation of Bacteria Antagonistic to Postharvest Fungal Diseases of Cold-Stored *Brassica* spp. **Phytoparasitica**, v.20, p.143-148, 1992.

- Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial plant disease.** Oxford: Blakwell Scientific Publications, 1987. 216p.
- Levy, E., Carmeli, S. Biological control of plant pathogens by antibiotic-producing bacteria. **Allelopathy**, v.582, p.300-309, 1995.
- 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, 1997. 72p.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 13 de Julho de 2010.
- Massomo, S. M. S., Mortensen, C. N., Mabagala, R. B., Newman, M. A., Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with Bacillus strains. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.98-105, 2004.
- Maude, R. B., Humphersonjones, F. M. Studies on the Seed-borne phases of dark leaf-spot (*Alternaria brassicicola*) and Grey geaf-spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas. **Annals of Applied Biology**, v.95, p.311-319, 1980.
- Messiaen, C., Blancad, D., Rouxel, F., Lafon, R. **Enfermedades de las hortalizas.** Madrid: Mundi-Prensa, 1995. 575p.
- Nega, E., Ulrich, R., Werner, S., Jahn, M. Hot water treatment of vegetable seed - an alternative seed treatment method to control seed-borne pathogens in organic farming. **Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz - Journal of Plant Diseases and Protection**, v.110, p.220-234, 2003.
- Peruch, L. A. M., Michereff, S. J. Sobrevivência saprofítica de *Alternaria brassicicola* e manejo de restos foliares de brócolos. **Ciência Rural**, v.37, p.13-18, 2007.
- Reifschneider, F. J. B., Siqueira, C. B., Cordeiro, C. M. T.. **Índice de doenças de hortaliças no Brasil: bactérias e fungos.** Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1983. 61 p.
- Rikken, G. B.; Kroon, A. G. M., van Ginkel, C. G. Transformation of (per)chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.420-426, 1996.
- Rimmer, S. R.; Shattuck, V. I.; Buchwaldt, L. **Compendium of Brassica Diseases.** Saint Paul: APS Press, 2007. 117 p.

- Romeiro, R. S. **Controle Biológico de Enfermidades de Plantas - Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007a. 269p.
- Romeiro, R. S. **Controle Biológico de Enfermidades de Plantas - Procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007b. 172p.
- Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001c. 279p.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., Kloepper, J. W. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.4927-4932, 2003.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic bacteria**. 3. ed. St. Paul: APS press, 2001. 373p.
- Schaad, N. W., White, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in Soil. **Phytopathology**, v.64, p.1518-1520, 1974.
- Schwyn, B., Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.
- Simmons, E. G. **Alternaria: An Identification Manual**. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Series 6, 2007. 775p.
- Song, Y., Logan, B. E. Inhibition of aerobic respiration and dissimilatory perchlorate reduction using cyanide. **FEMS Microbiology Letters**, v.239, p.229–234, 2004.
- Tuite, J. **Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess Pub. Company, 1969. 239p.
- Vale, F. X., Fernandes Filho, E. I., Liberato, J. R. Quant - a Software for plant disease severity assessment. In: 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, 2003. New Zealand. **Anais Christchurch New Zealand**, p.105, 2003.
- Van Toor, R. F., Pay, J. M., Jaspers, M. V., Stewart, A. Evaluation of phylloplane microorganisms for biological control of camellia flower blight. **Australasian Plant Pathology**, v.34, p.525-531, 2005.
- Varalakshmi, B., Ganeshan, G., Gopalakrishnan, C., Pushpalatha, A., Chethana, B.S. Identification of sources of resistance to alternaria leaf spot (*Alternaria brassicicola*), black rot (*Xanthomonas campestris*) and downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower (*Brassica oleraceae*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.79, p.482-483, 2009.

- Varma, A., Chincholkar, S. **Microbial Siderophores**. New York: Springer, 2007. 255 p.
- Verma, P.R., Saharan, G.S. **Monograph on Alternaria diseases of crucifers**. Saskatoon: Saskatoon Research Centre, 1994. 162p.
- 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.8, p.705-713, 1972.
- Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado, 2005.
- Williams, P. H. Blackrot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, v.64, p.736-742, 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. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (ICE+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (ICE-) biological control agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3128-3137, 1994.
- Windels, C. E., Lindow, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS press, 1985. 169p.
- Zambolim, L., Vale, F. X. R., Costa, H. **Controle Integrado das Doenças de Hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 1997. 122p.
- Zou, C. S., Mo, M. H., Gu, Y. Q., Zhou, J. P., Zhang, K. Q. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.2371-2379, 2007.