

FLÁVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA

**EFETIVIDADE DE FORMULAÇÕES DE PROCARIOTAS
RESIDENTES DE FILOPLANO NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO TOMATEIRO**

Tese 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
2004**

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

T

G216e
2004

Garcia, Flávio Augusto de Oliveira, 1977-
Efetividade de formulações de procariotas residentes
de filoplano no controle biológico de doenças do tomateiro
/ Flávio Augusto de Oliveira Garcia. – Viçosa : UFV,
2004.
xi, 42f. : il. ; 29cm.

Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 34-42

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. Agentes no controle biológico de pragas. 3. Procariotes.
4. *Bacillus cereus*. 5. *Pseudomonas putida*. I.Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 20.ed. 635.642996

FLÁVIO AUGUSTO DE OLIVERIA GARCIA

**EFETIVIDADE DE FORMULAÇÕES DE PROCARIOTAS
RESIDENTES DE FILOPLANO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
DOENÇAS DO TOMATEIRO**

Tese 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: 04 de Agosto de 2004

Prof. José Rogério de Oliveira
(Conselheiro)

Dr. Harllen Sandro Alves Silva
(Conselheiro)

Prof. Luiz Antônio Maffia

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

A Deus...

Aos meus pais Sebastião e Odete.

Aos meus irmãos Marcelo e Rita de Cássia.

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro.

À Érica Dias Gomes.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em toda sua excelência, e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização desse curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante toda a execução do trabalho.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro, pela amizade, pelo carinho, pela orientação e por acreditar em mim durante todo o tempo.

Ao professor José Rogério de Oliveira, pelos conselhos e pela valiosa amizade.

Ao Doutor Harllen Sandro Alves Silva, pela disposição em ajudar desde os meus primeiros passos na fitopatologia e pela amizade.

Aos colegas de laboratório Sandro, Bernardo, Renato, Dirceu, Carol, José Roberto, Henrique, Dora, Robertinho e Gisele, por fazer do laboratório não um lugar de trabalho e sim uma grande família.

Ao Professor Luiz Antonio Maffia, pelos preciosos conselhos, paciência e atenção dispensada.

Aos Professores Francisco Alves Ferreira e Acelino Couto Alfenas, por me ensinarem a admirar a Fitopatologia.

A todos os Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos que me foram generosamente transmitidos.

Aos companheiros de Fitopatologia Adriana, Alessandra, Antônio, Reginaldo, Plínio, pela amizade e companhia.

À Juliana, pelo carinho, dedicação e amizade.

Aos amigos e irmãos do peito Ricardo, Dedé por sempre estarem do meu lado nos piores momentos.

Aos amigos do Gouveião Mol, Slash, Mauricinho, Broa, Thiago, pela companhia prazerosa.

Aos meus irmãos Marcelo e Rita, a quem tanto amo.

À Érica, pela companhia, pelo carinho, pelo amor e por ter trazido a harmonia de que tanto necessitava para concluir esse trabalho.

Aos meus pais Sebastião e Odete, por terem me dado a vida.

A todo o povo brasileiro que custeou os meus estudos desde o primeiro grau até esse trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

FLÁVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA, filho de Sebastião Garcia Barbosa e Odete de oliveira Garcia nasceu em 17 de maio de 1977, na cidade de Viçosa-MG.

Em março de 2003, graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Iniciando no mesmo mês o Curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração em Bacteriologia de Plantas, sob orientação do Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, tendo defendido tese em 04 de agosto de 2004.

Atualmente, encontra-se cursando o Doutorado em Fitopatologia na mesma instituição.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	4
Formulação de agentes de controle biológico e suas implicações.....	4
Bactérias de rizoplano e controle biológico de doenças de plantas.....	7
Bactérias residentes de filoplano e controle biológico de doenças de plantas.....	8
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 – CULTIVO E PRESERVAÇÃO DOS ANTAGONISTAS.....	11
3.2 – FORMULAÇÕES COMERCIAIS	11
3.3 – FORMULAÇÃO PROPOSTA.....	12
Preparo do extrato aquoso de <i>s. Cerevisiae</i>	13
3.4 – PROSPECÇÃO DE REPRESSIVIDADE DE CINCO FORMULAÇÕES AOS TRÊS RESIDENTES DE FILOPLANO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DO TOMATEIRO	13
3.5 – PROSPECÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO QUANTO À VIDA DE PRATELEIRA	15
3.6 – EFETIVIDADE DE FORMULAÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PARTE AÉREA DO TOMATEIRO EM CASA DE VEGETAÇÃO.	16
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 – PROSPECÇÃO DE REPRESSIVIDADE DE CINCO FORMULAÇÕES A TRÊS RESIDENTES DE FILOPLANO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DO TOMATEIRO	18
4.2 – PROSPECÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO QUANTO À VIDA DE PRATELEIRA	22

4.3 – EFETIVIDADE DE CINCO FORMULAÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PARTE AÉREA DO TOMATEIRO EM CASA DE VEGETAÇÃO.	28
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34

RESUMO

GARCIA, Flávio Augusto de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2004. **Efetividade de formulações de procariotas residentes de filoplano no controle biológico de doenças do tomateiro.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: José Rogério de Oliveira e Harllen Sandro Alves Silva.

Três procariotas obtidos de filoplano de tomateiro (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Novosphingobium capsulatum*), previamente selecionados como bons antagonistas de patógenos da cultura foram formulados em cinco formas distintas e avaliados quanto a sua efetividade como agentes de biocontrole. Quatro das cinco formulações, consistiam de produtos comerciais (Agromil-Raiz, Agromil-S, Ecolife⁴⁰ and ISR 2000) os quais propágulos dos antagonistas foram incorporados. A quinta formulação foi proposta no presente trabalho e consiste de uma solução de nutrientes com estratos de parede de células de *Saccharomyces cerevisiae* e goma xantana. Os efeitos deletérios das formulações sobre o crescimento dos antagonistas bem como a sobrevivência foram investigados. Os resultados indicam que Agromil-S e ISR 2000 tem efeito inibitório sobre o crescimento dos antagonistas os outros produtos não interferem significativamente na multiplicação dos antagonistas. A vida de prateleira dos antagonistas na formulação proposta foi estudada e nenhuma foi eficiente em aumentar a sobrevivência quando comparadas com o controle. O biocontrole experimental

de doenças do tomateiro induzidas por três patógenos *Corynespora cassiicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e oídio respectivamente, em casa de vegetação foi tentado para todos aos antagonistas e para todas as formulações, o controle foi alcançado embora em alguns casos não se encontrou diferença significativa entre o tratamento e o controle. Mais esforços e pesquisas devem ser realizados afim de melhorar a proteção de células a serem dispensadas em plantas.

ABSTRACT

GARCIA, Flávio Augusto de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2004. **Prokaryotic phylloplane residents in formulation to improve control efficiency of tomato diseases.** Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee Members: José Rogério de Oliveira e Harllen Sandro Alves Silva.

To improve each antagonist efficiency as control agent of tomato leaf diseases, a study was carried out on five distinct formulae consisting of additives and one out of three autochthonous, isolated prokaryotic residents (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Novosphingobium capsulatum*) of the tomato phylloplane and already selected as good antagonists to tomato pathogens. Four of these five formulations consisted of commercial products (Agromil-Raiz, Agromil-S, Ecolife⁴⁰ and ISR 2000) to which each antagonist living propagules were incorporated. The fifth of these combinations consisted of a nutrient solution amended with a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall extract along with xanthan gum. Therefore, under consideration were the effects of each formula on each antagonist protective action and survival. Results of in vitro studies indicated that Agromil-S and ISR 2000 inhibited the antagonists' growth while the others didn't interfere in a significant way with the antagonists' multiplication. In shelf life experiments, none of the studied formulation was efficient enough to increase significantly the antagonist survival when compared to controls. Under greenhouse conditions, every antagonist, in all formulas, controlled the tomato leaf diseases caused by *Corynespora*

cassicola, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, or *Oidium* sp., although differences between some treatments and controls were not significant. We feel that with this we have only begun our efforts to find ways to improve protection of the antagonist's living cells being delivered to tomato plants, and which will render them eventually well protected against leaf pathogens.

1 – INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma solanácea amplamente cultivada em todo o mundo (Filgueira, 2000; Jones *et al.*, 1991). No Brasil a área cultivada é de cerca de 50.000 ha/ano, com produção girando em torno de 3,6 milhões de toneladas (Ministério da Agricultura, 2004).

Segundo Agrios (1997), Jones *et al.* (1991) e Lopes & Santos (1994), a cultura do tomateiro hoje, é suscetível a mais de 200 doenças incitadas por fungos, bactérias, vírus, nematóides e micoplasmas.

Devido à alta suscetibilidade a patógenos, assim como a pragas, o cultivo dessa solanácea nos moldes da agricultura atual torna-se possível somente através do intenso uso de agrotóxicos. Esses produtos são deletérios ao meio ambiente e à saúde humana (Carrer Filho; 2002; Romeiro, 1999; Silva, 2002), do risco de perderem a sua efetividade no controle de doenças por surgimento de populações resistentes, como já relatado para vários fungicidas (Chiou, 2003; Gisi, 2000; Ishii, 2001; Köller, 2001; Parlevliet, 1979). Adicionalmente, vale ressaltar que, para doenças incitadas por bactérias, não há, no mercado, um produto químico específico nem de eficiência comprovada para o controle desses patógenos (Romeiro, 1995; Wilson *et al.*, 2002).

Além do controle químico, outras medidas são utilizadas para a redução dos danos causados por fitopatógenos (Bergamin Filho *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1991). Dentre essas medidas de manejo, pesquisadores do mundo inteiro têm proposto o controle biológico como uma alternativa para a redução ou

mesmo a substituição do uso de agrotóxicos (Baker & Cook, 1974; Carrer Filho, 2002; Cook & Baker, 1983; Costa *et al.*, 2001; Halfeld-Vieira, 2002; Romeiro & Garcia, 2003; Silva, 2002; Steddom & Menge, 2001; Steddom *et al.*, 2002).

Segundo Baker & Cook (1974), controle biológico é a “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, 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”. Dentre os organismos a que se referem os autores, os bactérias são os mais estudados e utilizados.

O controle biológico de doenças de plantas, segundo Cook & Baker (1983) e Romeiro & Garcia (2003), já era utilizado empiricamente há milhares de anos. Os mesmos autores postulam que o uso consciente de microrganismos como agentes de biocontrole só ocorreu no início do século XX.

Atualmente no mundo inteiro tem-se pesquisado essa ferramenta de manejo de doenças de plantas, sua aplicação e implicações. Vários autores vêm estudando o biocontrole através de bactérias, para o manejo de doenças do tomateiro em condições experimentais (Carrer Filho, 2002; Halfeld-Vieira, 2002; Halfeld-Vieira *et al.*, 2002; Moura, 1996; Nemeč *et al.*, 1996; Sabaratnam & Traquair, 2002; Silva, 2002; Sharma & Nowak, 1998; Steddom & Menge, 2001). Porém, segundo Bashan (1998), muitos isolamentos bacterianos citados na literatura como promissores não chegam ao mercado devido provavelmente a problemas na formulação.

Uma boa formulação de bactérias agentes de biocontrole visa a utilização desses microrganismos de forma comercial e que atenda a alguns requisitos: ser de fácil aplicação, proteger o antagonista da ação do meio por um certo período de tempo, ter uma boa vida de prateleira, melhorar o desempenho do antagonista no controle de doenças, não ser tóxico ao homem e a animais e promover um micro ambiente que impeça o rápido declínio populacional (Bashan, 1998; Chiou & Wu, 2003; Connick *et al.*, 1990; Janisiewicz & Jeffers, 1997; Steddom *et al.*, 2002; Stockwell *et al.*, 1998). Uma formulação com essas características é capaz de garantir ao antagonista

condições adequadas, de modo a favorecer sua atividade, aumentando a sua eficiência na proteção do vegetal.

O presente trabalho teve como objetivo, desenvolver uma formulação de três procariotas residentes de filoplano, a saber: *Bacillus cereus* e *Novosphingobium capsulatum*, previamente selecionados de um universo de 300 isolamentos obtidos de filoplano de plantas sadias de tomateiro e exaustivamente testados em laboratório, casa de vegetação e campo (Halfeld-Vieira, 2002) e um isolamento de *Pseudomonas putida*, oriundo do laboratório de Epidemiologia do DFP/UFV.

Essa formulação foi proposta com objetivo de melhorar o desempenho desses antagonistas no biocontrole de patógenos fúngicos e bacterianos do tomateiro. Testou-se *in vitro* se a formulação era repressiva aos procariotas e avaliou-se em casa de vegetação a eficiência da formulação no controle de doenças da cultura.

Também foi testado o potencial repressivo aos três isolamentos bacterianos das quatro formulações comerciais: Agromil-S, Agromil-Raiz e Ecolife⁴⁰, fabricados pela Química Natural Brasileira Ltda. (Quinabra), e ISR 2000, fabricado pela Improcrop do Brasil, bem como a avaliação em casa de vegetação da eficiência do uso desses produtos com os antagonistas no controle biológico de doenças do tomateiro.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

FORMULAÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E SUAS IMPLICAÇÕES

O uso de microrganismos na agricultura é uma prática bem antiga, embora muitas vezes tenha sido feito de forma indireta. Bashan (1998) menciona que antigos agricultores já conheciam o fato de que se cultivassem plantas não leguminosas em um substrato composto de uma parte de solo cultivado com plantas leguminosas (plantas com histórica associação com rizobactérias), as primeiras tinham sua produção aumentada. Algumas práticas empíricas de produção, utilizadas durante a evolução da agricultura, provavelmente envolviam o controle biológico (Cook & Baker, 1983). Os egípcios, antes da era cristã, cultivavam cebola nas margens do rio Nilo, utilizando-se dos benefícios de suas inundações cíclicas, formando um filme de água às margens do rio, o que favorecia a sobrevivência de populações de microrganismos antagonistas na microbiota do solo, evitando assim a ocorrência de podridão branca (*Sclerotium cepivorum*) (Cook & Baker, 1983; Romeiro & Garcia, 2003).

As primeiras tentativas de aplicação direta do controle biológico de doenças de plantas deu-se por Hartley na década de 1920, para o controle de “*damping off*” em viveiros de pinos (Cook & Baker, 1983). Dessas primeiras

tentativas até os dias atuais o controle biológico tem evoluído muito, sendo possível encontrar formulações comerciais de agentes de controle biológico tais como Kodiak, Epic, Serenade, Nogall (Chiou & Wu, 2003).

Essas formulações são importantes por possibilitar que antagonistas que se mostraram eficientes no controle de doenças, em nível experimental, possam ser disponibilizados de forma efetiva, segura e padronizada para o uso em escala comercial (Amer & Utkhede, 2000; Steddom & Menge, 2001; Vidhyasekaran *et al.*, 1997a). A formulação atuará criando um micro ambiente favorável ao antagonista após sua liberação no local desejado, de forma a auxiliá-lo na colonização desse nicho.

Segundo Bashan (1998) e Stockwell *et al.* (1998), logo após a introdução de bactérias no solo ou no filoplano, observa-se um declínio populacional. O rápido estabelecimento populacional é importantíssimo para que se garanta a sobrevivência do antagonista, seja na rizosfera ou no filoplano, sendo que nessa fase é que muitos isolamentos que se mostraram eficientes em ensaios de laboratório e casa de vegetação, falham ao serem testados em campo (Stockwell *et al.*, 1998). O microrganismo antagonista deve ser capaz de competir com a microbiota nativa local, a qual, presumivelmente, é mais adaptada a esse habitat do que a população que está sendo introduzida. Logo, a formulação desse microrganismo lhe propiciaria uma condição mais favorável, mesmo que por um curto espaço de tempo, afim de que possa evitar o declínio populacional do antagonista recém aplicado no ambiente. No filoplano, as populações bacterianas residentes não estão distribuídas em padrões uniformes por toda a superfície foliar. Elas estão concentradas em regiões onde ocorre acúmulo de nutrientes (Beattie & Lindow 1999; Lindow & Bradl, 2003). Assim, um microrganismo formulado terá maior chance de encontrar essas “ilhas” de concentração de nutriente, caso não caia sobre uma dessas regiões ao ser aplicado, do que um outro não veiculado por uma formulação, devido à maior chance de sobrevivência conferida pela formulação.

Um outro fator inerente à formulação de agentes de biocontrole refere-se à operacionalidade de uso. Muitos trabalhos relatam o emprego de suspensão em água de propágulos do antagonista (Braun-Kiewnick *et al.*, 2000; Capdeville *et al.*, 2002; Carrer Filho, 2002; ; Chanway, 1997; Halfeld-

Vieira, 2002; Halfeld-Vieira *et al.*, 2002; Silva, 2002; Wilson *et al.*, 2002). Para Vidhyasekaran *et al.* (1997a) e Vidhyasekaran *et al.* (1997b), o uso de células bacterianas em suspensão aquosa, por exemplo, torna-se difícil para o produtor, devido à necessidade de um laboratório para o cultivo do microrganismo antagonista e para o preparo da suspensão a ser aplicada. O uso de células em suspensão também se tornaria complicado do ponto de vista da quantidade de biomassa do antagonista que deveria ser produzida, para a aplicação. Em muitos casos é necessário a utilização de grande quantidade de propágulos para que se tenha uma eficiência desejada no controle, o que seria inconcebível em propriedades rurais de pequeno ou médio porte (Bashan, 1998; Steddom & Menge, 2001).

Há várias formas de se formular um microrganismo, como pós, pastas fluídas, granulares ou líquidas (Bashan, 1998). Podem ser utilizados como veículo vários tipos de materiais, como solo, resíduos vegetais e material inerte. O veículo é a fração inerte da formulação, responsável pela entrega do antagonista da linha de produção para o campo, correspondendo à maior fração do formulado. O importante é que esse veículo auxilie o antagonista, a fim de que a formulação tenha a capacidade de liberar o número correto de células viáveis do antagonista em boas condições fisiológicas e por um bom tempo e, ainda, possa ser facilmente esterilizado, manufaturado e misturado por equipamentos já existentes na agroindústria, apresentar razoável facilidade para o ajuste de pH e baixo preço, ser de fácil operacionalidade, isto é, poder ser aplicado com as máquinas e implementos de uso comum na agricultura, ser um produto que cause o menor impacto ambiental possível, além de não apresentar riscos ao homem e animais e, por fim, possuir uma boa vida de prateleira (Bashan, 1998).

Muitas vezes, faz-se necessário o uso de adjuvantes em conjunto com a formulação (Medugno, 1995). Adjuvantes são produtos que visam melhorar a eficiência de formulações e podem ser utilizados para a proteção do antagonista como, por exemplo, contra a ação da radiação UV, como fonte nutricional auxiliando no estabelecimento, como espalhantes, agentes molhantes, supressores de espuma e solubilizantes (Medugno, 1995; Chiou & Wu, 2003; Connick *et al.*, 1990).

BACTÉRIAS DE RIZOPLANO E CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS.

O uso de microrganismos procariotas habitantes da rizosfera com potencial para promover o crescimento e atuar no controle biológico tem sido amplamente pesquisado (Burr *et al.*, 1978; Carrer Filho, 2002; Kloepper & Schroth, 1978; Kloepper *et al.*, 1980; Moura, 1996; Silva, 2002; Silva *et al.*, 2004).

O solo é habitat de complexa comunidade biológica, da qual microrganismos procariotas constituem maioria, tanto em número quanto em diversidade. Alguns procariotas têm como nicho ecológico a rizosfera, e ou, rizoplano de plantas, onde há intenso acúmulo de compostos orgânicos advindos de exsudados radiculares (Chanway, 1997; Romeiro, 1999) e essas bactérias são denominadas de rizobactérias (Romeiro, 1999).

As rizobactérias podem atuar no biocontrole por mecanismos de antagonismo direto ou por indução de resistência de plantas a fitopatógenos (Romeiro, 1999; Romeiro, 2002; Romeiro & Garcia, 2003; Silva, 2002; Silva *et al.*, 2004,).

Um dos problemas na utilização de rizobactérias no controle biológico é quanto à sua forma de veiculação e aplicação (Amer & Utkhede, 2000; Gasoni *et al.*, 1998), o que torna importante o desenvolvimento de formulações que favoreçam o antagonista e que possam atuar na liberação de propágulos do agente de biocontrole no solo (Xi *et al.*, 1996).

Várias formulações de rizobactérias têm sido testadas com relativo sucesso, quando comparadas com agrotóxicos existentes no mercado e com a aplicação de suspensão de células bacterianas em água.

Gasoni *et al.* (1998), testaram três formulações contendo como ingrediente ativo células de *Bacillus cereus*, *B. pumilus* e *Pseudomonas fluorescens*, aplicadas a sementes, onde duas dessas foram efetivas no controle de tombamento de plantas causado por *Rhizoctonia solani*. Sabaratnam & Traquair (2002) formularam um isolamento de *Streptomyces* sp., obtido de rizosfera de plantas de tomateiro, e testaram-no contra o

tombamento (*R. solani*). A formulação mostrou-se eficiente no controle da doença.

Um isolamento de *P. fluorescens* foi formulado e testado contra *Fusarium udum*, agente etiológico da murcha do feijão guandu. A formulação controlou o patógeno em dois campos experimentais, promovendo aumento na produção da cultura (Vidhyasekaran *et al.*, 1997b). Xi *et al.* (1996) conseguiram controlar a podridão radicular em plantas de ervilha com uma formulação de *P. fluorescens*.

BACTÉRIAS RESIDENTES DE FILOPLANO E CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS.

A descoberta de populações residentes de microrganismos na superfície de folhas, capazes de influenciar fitopatógenos em seus processos de infecção foliar, despertou o interesse de pesquisadores para o uso desses microrganismos no controle biológico (Bettiol, 1991). A microbiota foliar é composta basicamente por microrganismos residentes e casuais, segundo Leben (1965), citados por Bettiol (1991). Microrganismos casuais são aqueles que não podem crescer na superfície da planta, que estão ali por um evento ocasional. Microrganismos residentes do filoplano ou epífitas são aqueles com capacidade de crescer e se multiplicar na superfície foliar das plantas (Beattie & Lindow, 1999; Bettiol, 1991; Lindow & Bradl, 2003; Yang *et al.*, 2000).

O filoplano é de composição complexa, e em superfícies de folhas de algumas plantas já foram encontradas mais de 78 espécies de bactérias (Beattie & Lindow, 1999; Lindow & Bradl, 2003; Romeiro & Garcia, 2003; Yang *et al.*, 2000). Dessas, poucas são capazes de influenciar na saúde do hospedeiro, umas poucas em condições adequadas podem atuar como patógenos e outras atuando em benefício da planta (Bargabus *et al.*, 2002; Beattie & Lindow, 1999).

Ao contrário da rizosfera, o filoplano praticamente não oferece qualquer proteção contra os eventos ambientais. A microbiota está altamente exposta aos efeitos de variação de temperatura e umidade, exposição à radiação UV e

podem ser lavados por chuva (Beattie & Lindow, 1999; Bettiol, 1991; Lindow & Bradl, 2003). A estratégia de sobrevivência desses microrganismos baseia-se na tolerância a essas condições adversas. Lindow & Bradl (2003), relatam que a superfície foliar propicia uma limitada fonte de nutrientes para as bactérias que tentam colonizá-la. Logo, a ocorrência dessas bactérias se dá em pontos específicos da superfície foliar, onde se tende a formar concentrações de nutrientes (Beattie & Lindow, 1999; Lindow & Bradl, 2003;).

Em geral, os mecanismos pelos quais os microrganismos residentes de filoplano atuam no controle de doenças de plantas são os de antagonismo direto. Porém, trabalhos têm demonstrado que esses microrganismos também podem ser indutores de resistência. Halfeld-Vieira (2002) testou alterações na atividade enzimática de plantas quando estas eram colonizadas pelo antagonista, um isolamento de *Bacillus cereus* oriundo de filoplano de plantas de tomateiro, quando inoculadas com um isolamento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e quando eram colonizadas pelo antagonista e após quatro dias inoculadas com a Pst. A atividade de cinco enzimas indicadoras do estado de indução foi investigada. Observou-se o aumento de atividade de peroxidase (PO), demonstrando haver indícios de que esta filobactéria é capaz de induzir resistência em plantas. Bargabus *et al.* (2002), estudando um isolamento de *Bacillus mycoides*, uma bactéria habitante do filoplano de plantas de beterraba, demonstraram de forma cabal que microrganismos residentes de filoplano, são capazes de induzir resistência em plantas. Essa descoberta é de imensa importância, confirmando a potencialidade do uso desses microrganismos no controle de doenças de plantas.

Assim como o que ocorre com rizobactérias, a utilização de bactérias residentes do filoplano no biocontrole deve ser feita através de antagonistas formulados. No filoplano a formulação torna-se mais importante, pois o ambiente é mais inóspito que o do rizoplano.

Um bom antagonista residente de filoplano, deve naturalmente ser apto a sobreviver em nichos pobres em nutrientes, ser tolerante à exposição de radiação UV e a baixa umidade, tolerar bem variações de temperatura, e ter um rápido estabelecimento populacional (Chiou & Wu, 2003). Essas características podem garantir o sucesso da formulação do agente de biocontrole (Sabaratnam & Traquair, 2002).

Várias formulações de microrganismos residentes de filoplano vêm sendo testadas, algumas com bons resultados. Krishnamurthy & Gnanamanickam (1998) relatam a eficiência de uma formulação de *P. fluorescens*, aplicada no filoplano de plantas de arroz, para o controle de *Pyricularia grisea*. Vidhyasekaran *et al.* (1997a) também relatam o controle de *P. grisea* em condições de casa de vegetação e campo, por uma formulação de *P. fluorensceus* quando aplicadas em sementes e folhas de arroz. Chiou & Wu (2003), utilizaram com sucesso uma formulação de *Bacillus amyloliquefaciens*, no controle do mofo cinzento (*Botrytis elliptica*), em plantas de lírio.

O uso de residentes de filoplano, pode ser também aplicável no controle biológico de doenças de pós-colheita. Janisiewicz & Jeffers (1997) estudaram o efeito de uma formulação comercial baseada em isolamentos de *P. syringae*, no controle do mofo azul (*Penicillium expansum*), e do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em frutos de maçã armazenados. A formulação mostrou-se eficiente em controlar ambas as doenças.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – CULTIVO E PRESERVAÇÃO DOS ANTAGONISTAS

Os antagonistas utilizados foram um isolamento de *Bacillus cereus* e um isolamento de *Novosphingobium capsulatum*, ambos isolados de filoplano de plantas de tomateiro sadias e testados em laboratório, casa de vegetação e em campo (Halfeld-Vieira, 2002), e um isolamento de *Pseudomonas putida*, oriundo de plantas de tomate, obtidos pelo laboratório de Epidemiologia do DFP/UFV com atividade antagonística *in vitro* a alguns patógenos fúngicos (Romeiro *et al.*, 2001).

3.2 – FORMULAÇÕES COMERCIAIS

Foram testadas quatro formulações comerciais de duas empresas distintas (Química Natural Brasileira Ltda. – Quinabra <http://www.quinabra.com.br> e Improcrop do Brasil http://12.44.217.241/Brasil/about/prod_impro.cfm), a saber:

a) Agromil-S – Estimulante orgânico produzido pela QUINABRA, com finalidade de aumentar o vigor da germinação de sementes e material vegetal propagativo. Sua composição qualitativa é: complexo de bioflavonóides cítricos, fitoalexinas cítricas, ácido ascórbico, acorbatos, estabilizante e veículo inerte.

b) Agromil-R – Produzido pela QUINABRA, que não disponibilizou a composição química.

c) Ecolife – Revigorante e antiestressante para plantas produzido pela QUINABRA, com finalidade de atuar no controle de fitomoléstias. Sua composição é: bioflavonóides cítricos, fitoalexinas cítricas, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico e veículo inerte.

d) ISR 2000 – Indutor de resistência produzido pela IMPROCROP, de uso ainda experimental, sendo composta por: ácido benzóico, *Lactobacillus plantarum*, leveduras, extrato de *Yucca schidigera*.

3.3 – FORMULAÇÃO PROPOSTA

A formulação proposta constituiu-se da seguinte forma: solução de Hoagland como fonte de micronutrientes (substrato de crescimento) na concentração final de 1/10 da solução original, na formulação; extrato aquoso de propágulos de *Saccharomyces cerevisiae* (indutor de resistência) a 1%; goma xantana (espessante, indutor de resistência), concentração final 0,01%; espalhante, Tween 80 (adjuvante de estabelecimento), concentração final 0,1%; sacarose como fonte de carbono (substrato de crescimento), concentração final 0,1%; células do antagonista na fase exponencial de crescimento, 10^8 ufc/mL em meio 523 de Kado & Heskett (1970); água (veículo).

PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DE *S. cerevisiae*

Como fonte de células de *S. cerevisiae* utilizou-se duzentos gramas do produto comercial Fermento Biológico Fresco Fleischmann, que foram dissolvidos em um litro de água destilada. A suspensão, após autoclavada por 30 minutos a 121°C afim de solubilizar as moléculas eliciadoras, foi mantida por uma hora em agitação, seguida de centrifugação a 15000g, por 10 minutos (Wulff & Pascholati, 1998), recolhendo-se o sobrenadante, que é o extrato aquoso.

3.4 – PROSPECÇÃO DE REPRESSIVIDADE DE CINCO FORMULAÇÕES AOS TRÊS RESIDENTES DE FILOPLANO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DO TOMATEIRO

Foi investigado, *in vitro*, o possível efeito repressivo de cinco formulações (descritas em 3.3 e 3.4) sobre a multiplicação de três procariontes residentes de filoplano, *B.cereus*, *N. capsulatum* e *P. putida*.

As quatro formulações comerciais (item 3.3) foram testadas nas concentrações de 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32, 0,64 e 1,28%, em água, com o pH previamente ajustado para 7,0. Efetuaram-se três ensaios.

a) No primeiro ensaio, células dos antagonistas foram cultivadas em tubos de ensaio, contendo 5mL de meio 523 de Kado & Heskett (1970) líquido, por 24 horas a 28°C. Propágulos do antagonista foram dispensados em frascos Erlenmeyer contendo 100mL de meio 523 semi-sólido fundente, seguindo-se dispensa em placas de Petri. Anteriormente, foi vertido sobre essas placas uma camada básica de agar - água, de modo a formar uma sobrecamada e, após, depositou-se sobre a superfície do meio na placa discos de papel, e sobre eles 10µL de cada diluição da formulação, tendo como controle discos umedecidos com água destilada estéril. As placas foram colocadas em BOD 28°C por 24 horas, onde o parâmetro avaliado foi o

diâmetro do halo de inibição quando esse foi formado. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento.

b) No segundo ensaio, as formulações preparadas nas oito concentrações já mencionadas e o controle, água destilada estéril, foram dispensadas em Erlenmeyer contendo 20mL de meio 523 semi-sólido fundente, vertendo-se em seguida em placas de Petri. Os antagonistas foram cultivados em meio 523 líquido contendo glicose (5%) como fonte de carbono. Alíquotas de 30 μ L de células dos antagonistas, na fase exponencial foram retiradas e diluídas em 100mL de solução salina 0,85% (0,3% de Tween 80). Retiraram-se 30 μ L das diluições, depositando-as sobre a superfície das placas, espalhando-as com alça de Drigalsky. As placas foram mantidas a 28°C e, após 24 horas, avaliou-se o número de colônias surgidas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Procedeu-se a análise de regressão linear dos dados obtendo-se sua equação.

c) No terceiro ensaio, testou-se o eventual efeito repressivo *in vitro* da formulação proposta sobre a multiplicação dos isolamentos de *P.putida*, *B. cereus*, *N. capsulatum*. Culturas em meio 523 líquido na fase exponencial de crescimento foram repicadas (100 μ L) para frascos tipo "side-arm" contendo a formulação proposta, 100mL, e para frascos contendo meio 523. Os frascos foram mantidos sob agitação contínua a 30°C, sendo realizadas estimativas da turbidez em intervalos regulares de 2 horas. O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Ao final obteve-se a curva de crescimento das culturas na formulação proposta e no meio 523, para cada isolamento. A área abaixo da curva de crescimento bacteriano (AACCB) foi estimada para cada antagonista, aplicando o teste F ($P=0,05$) para verificação do efeito do tratamento.

3.5 – PROSPECÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO QUANTO À VIDA DE PRATELEIRA

A formulação proposta nesse trabalho (item 3.3) foi testada quanto à sua capacidade de manter a viabilidade das células dos antagonistas por um período de quatro meses. Para tanto, foram depositados, em frascos de penicilina, 250µL de propágulos do antagonista (10^8 ufc/mL) veiculados na formulação e em água. Utilizaram-se três frascos para cada formulação, sendo um frasco com de 0,5g de celulose moída, um frasco com 0,3g de sílica texturizada e um frasco com 1,75g de fubá de milho, todas as três usadas como agentes secantes.

Após a deposição das alíquotas das formulações, os frascos foram transferidos para um dessecador, durante sete dias e foram armazenados em local seco e em temperatura ambiente, exceto os frascos que foram utilizados para a avaliação inicial. O ensaio foi feito com quatro avaliações, as quais foram realizadas em intervalos mensais. No momento de cada avaliação, o conteúdo da cada frasco foi coletado em 4mL de solução salina 0,85% contendo 0,3% Tween 80 e agitado em agitador de tubos, procedendo-se, em seguida, a diluição seriada da suspensão obtida, usando a técnica de microgota (Romeiro, 2001), com três repetições por diluição. Foi contado o número de colônias surgidas na placa de modo a estimar o número de ufc/mL. A primeira avaliação foi realizada logo após a deposição das formulações nos frascos do dessecador e as demais nos meses seguintes. Para a análise do experimento, estimou-se o Log da ufc/mL, a partir dos valores obtidos e calculou-se a média para cada tratamento, avaliando-se então a tendência de sobrevivência dos antagonistas veiculados na formulação e em água, em relação aos três secantes.

3.6 – EFETIVIDADE DE FORMULAÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PARTE AÉREA DO TOMATEIRO EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Os antagonistas veiculados nas quatro formulações comerciais e na proposta neste trabalho foram testados quanto à efetividade em controlar três patógenos: *Corynespora cassiicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e oídio.

Células dos três antagonistas, na fase exponencial de crescimento em meio líquido, foram transferidas para as formulações, obtendo-se uma concentração final de 1×10^8 ufc/mL.

Os patógenos foram cultivados e preparados da seguinte forma: o fungo *Corynespora cassiicola* foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA por 20 dias a 27°C. Placas contendo as culturas esporulantes foram utilizadas para o preparo de uma suspensão de esporos em água destilada, por raspagem do crescimento fúngico com alça de Drigalsky, seguindo-se filtração em gaze. A concentração de inóculo no filtrado foi ajustada para 2×10^4 conídios/mL. A bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi cultivada em meio 523 de Kado & Heskett (1970) por 24 horas a 28°C. Células da bactéria foram suspensas em água, tendo sua concentração ajustada ($OD_{540nm}=0,3$), através do (ou então "no") espectrofotômetro Spectronic 20.

Plantas de tomateiro (30 dias) tiveram seu filoplano pulverizado com os agentes de biocontrole veiculados às formulações. O experimento contou com um total de doze tratamentos, três antagonistas aplicados, cada um nas formulações Agromil-Raiz, ISR 2000, na formulação proposta no trabalho e em água, e foi montado no esquema fatorial 4 X 3, com quatro repetições, três plantas por vaso.

Quatro dias após a pulverização do filoplano com as formulações, suspensão de propágulos dos patógenos *C. cassiicola* e *P. syringae* pv. *tomato* foi atomizada sobre a superfície foliar. As plantas foram colocadas em câmara de nevoeiro, a 25°C, por um período de 24 horas antes e 24 horas depois da inoculação. As plantas foram transferidas para câmaras de crescimento com temperatura ajustada para 26°C. A infecção por oídio ocorreu naturalmente na câmara de crescimento.

Após o surgimento dos sintomas, avaliou-se a severidade de doença. Os tratamentos controle eram constituídos por plantas pulverizadas com células dos antagonistas em suspensão aquosa (10^8 ufc/mL), e plantas pulverizadas somente com água, sem nenhum antagonista. Os valores de severidade obtidos foram transformados para um índice (“Ecorin” = eficiência na redução de severidade do fungo *C. cassiicola*; “Eoídio” = eficiência na redução de severidade do fungo oídio e “Epst” = eficiência na redução de severidade da bactéria *P. syringae* pv. *tomato*). O índice foi calculado da seguinte forma:

$$\left(\frac{S_n}{S_{\text{água}}} \right) \times 100$$
, sendo S_n a severidade de doença na planta, quando tratada com algum dos antagonistas, e $S_{\text{água}}$ a severidade de doença na planta, quando tratada apenas com água.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – PROSPECÇÃO DE REPRESSIVIDADE DE CINCO FORMULAÇÕES A TRÊS RESIDENTES DE FILOPLANO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DO TOMATEIRO

No primeiro ensaio, não foi observada a formação de halos de inibição para nenhuma formulação nas concentrações testadas para os três antagonistas. O não surgimento de halos de inibição pode inicialmente sugerir que todas as formulações comerciais não são repressivas aos antagonistas. Porém esse resultado pode ser atribuído à provável dificuldade de difusão de eventuais componentes antimicrobianos no gel.

No segundo ensaio, em que as formulações foram incorporadas ao meio de cultura, Agromil-S e Ecolife se mostraram altamente repressivas em todas as concentrações testadas e não houve crescimento de nenhuma colônia bacteriana nas placas contendo essas formulações. Os testes com Agromil-Raiz e ISR 2000 demonstraram que essas formulações foram repressivas a diferentes níveis de acordo com a concentração utilizada da formulação. Quanto menor a concentração da formulação no meio, maior o número de colônias por placa (Figura 1).

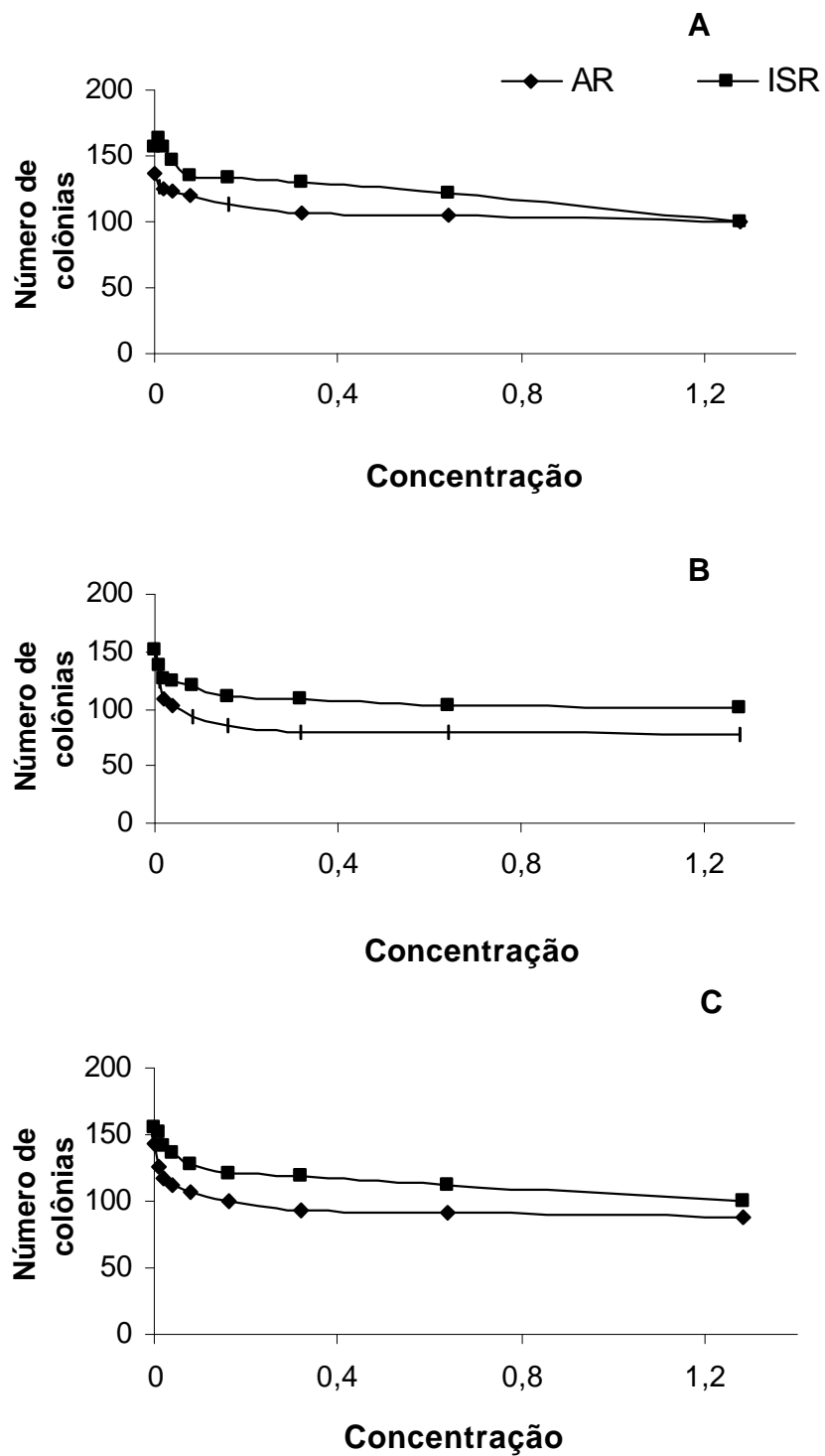


Figura 1 – Repressividade das concentrações das formulações incorporadas ao meio 523, sobre o crescimento dos antagonistas. **A** - *Novosphingobium capsulatum*, **B** - *Bacillus cereus*, **C** - *Pseudomonas putida*. Agromil- Raiz (AR), ISR 2000 (ISR).

Os elevados níveis de repressão das formulações Agromil-S e Ecolife aos antagonistas, indicam ser provável que tenham em sua composição substâncias antimicrobianas. A formulação Ecolife, por exemplo, foi desenvolvida como um produto de limpeza de estábulos (comunicação pessoal Sr. Wolfram Quintero, diretor presidente da Quinabra), sendo que, posteriormente é que foi descoberta a sua potencialidade para controle de doenças de plantas. Assim, algum de seus componentes ou a interação entre alguns deles pode ter causado o efeito repressivo tão evidente dessas duas formulações.

Agromil-Raiz e ISR 2000 inibiram o crescimento bacteriano, porém não foi de forma tão marcante quanto às duas formulações anteriores. Para estes dois produtos, a inibição foi gradativa de acordo com o aumento de suas concentrações no meio 523, ou seja, quanto mais concentrado, menor era o crescimento bacteriano. De acordo com os resultados, se forem utilizadas em concentrações mais baixas, as duas formulações são passíveis de serem trabalhadas com os três antagonistas, entretanto testes devem ser feitos para confirmar esta hipótese.

No terceiro ensaio, a comparação das AACCB, demonstrou que todos os antagonistas tiveram um melhor crescimento no meio 523, que na formulação proposta (Figura 1, 2 e 3).

O melhor crescimento dos antagonistas no meio 523 é atribuído à diferença de composição. O meio 523, usado como padrão em muitos laboratórios, inclusive no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico DFP/ UFV (Romeiro, 2001), disponibiliza para bactérias todos os nutrientes necessários para o seu crescimento em quantidades ótimas. Nessas incluem-se aminoácidos peptídeos de cadeia curta (caseína ácida hidrolisada), fatores de crescimento (extrato de levedura), uma fonte de carbono (sacarose ou glucose), íons PO_4^- e Mg^{++} , etc. (Kado & Heskett, 1970). A formulação proposta, além de não ter em sua composição a diversidade de nutrientes que o meio 523 possui, tem menor concentração de solutos. Por exemplo, a concentração de sacarose na formulação é de dez vezes menor que no meio 523. Assim, esse menor desenvolvimento na formulação que no meio não é aqui considerado um efeito repressivo e sim um efeito da diferença dos dois substratos, no que tange a disponibilidade nutricional.

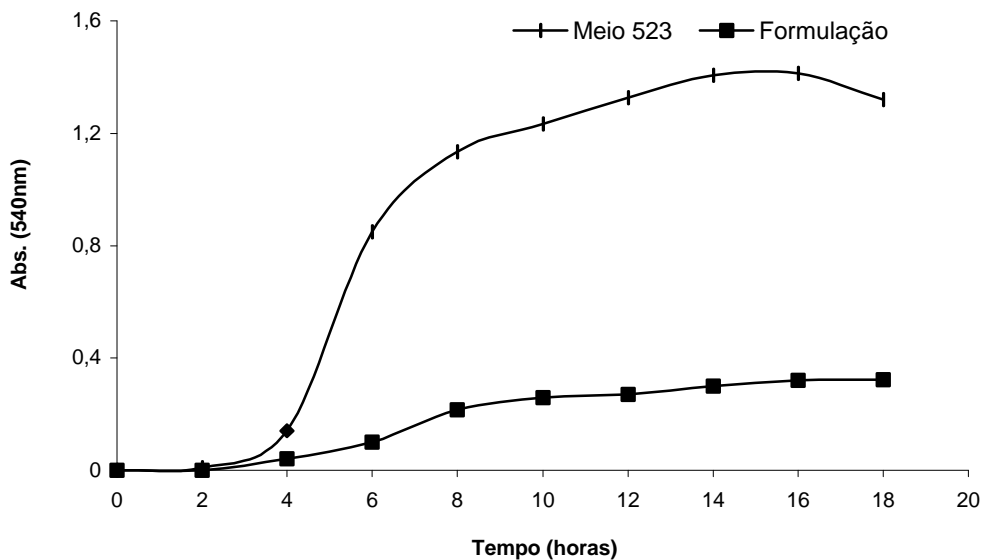


Figura 2 – Curva de crescimento para o isolamento *Bacillus cereus* no meio 523 e na formulação idealizada. As áreas abaixo da curva de crescimento bacteriano (AACCB), diferem estatisticamente pelo teste F a 5%.

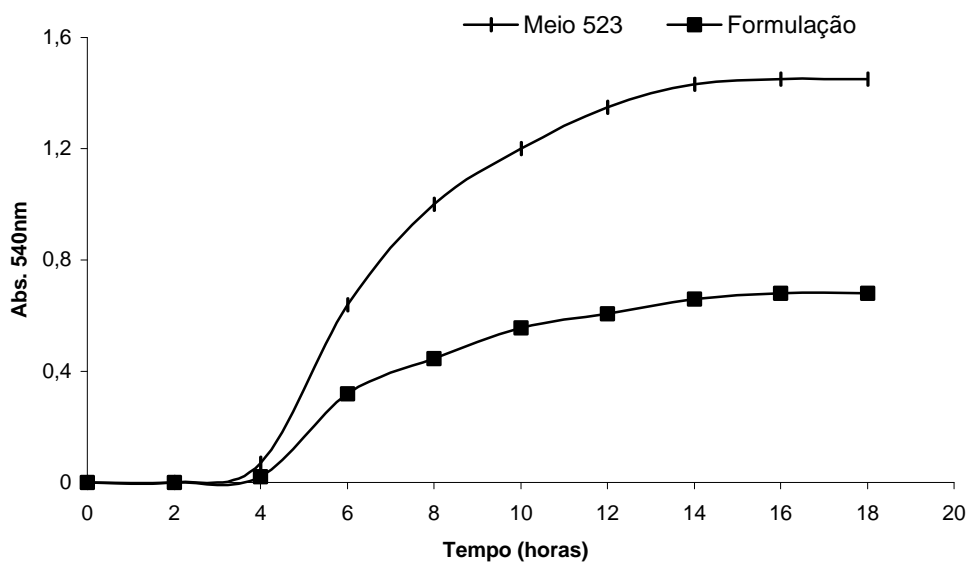


Figura 3 – Curva de crescimento para o isolamento *Novocphingobium capsulatum* no meio 523 e na formulação idealizada. As áreas abaixo da curva de crescimento bacteriano (AACCB), diferem estatisticamente pelo teste F a 5%.

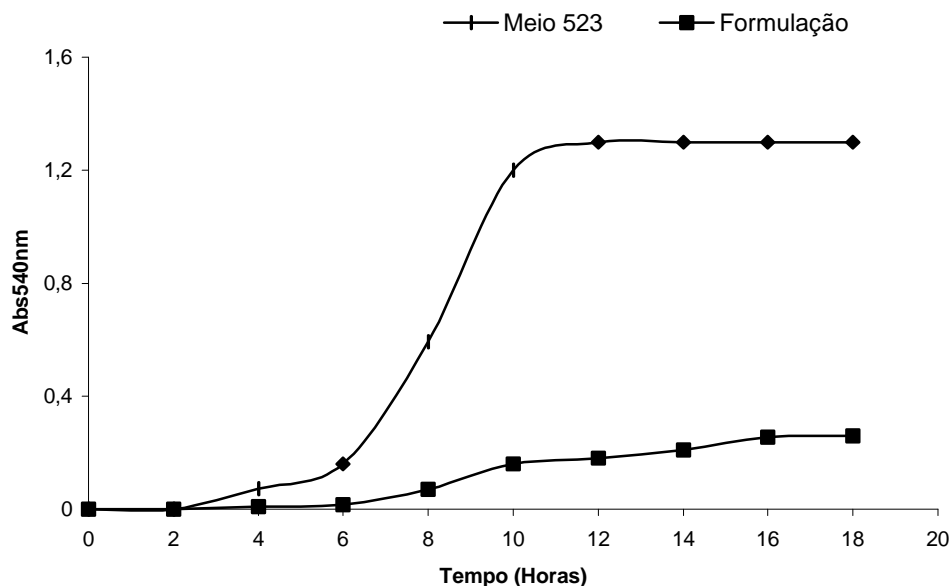


Figura 4 – Curva de crescimento para o isolamento *Pseudomonas putida* no meio 523 e na formulação idealizada. As áreas abaixo da curva de crescimento bacteriano (AACCB), diferem estatisticamente pelo teste F a 5%.

4.2 – PROSPECÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO QUANTO À VIDA DE PRATELEIRA

Para *N. capsulatum*, na primeira avaliação, tendo como secante o fubá de milho, o número de ufc/mL, quando veiculado na formulação proposta foi elevado, sendo bem superior que quando em água (Fiugra 5). Porém, na avaliação subsequente, houve uma redução drástica de ufc/mL do antagonista veiculado na formulação proposta, também havendo redução do número de ufc/mL no controle. Na terceira e na quarta avaliação não houve crescimento bacteriano nas placas. No secante sílica texturizada, o comportamento da bactéria foi muito semelhante ao do secante fubá de milho, apenas diferindo no número ufc/mL (Figura 6). Já no secante celulose, houve formação de colônia somente quando o antagonista era veiculado na formulação proposta. Aqui também houve uma redução de ufc/mL da primeira para a segunda avaliação e nas outras duas seguintes não houve formação de colônia nas placas (Figura 7).

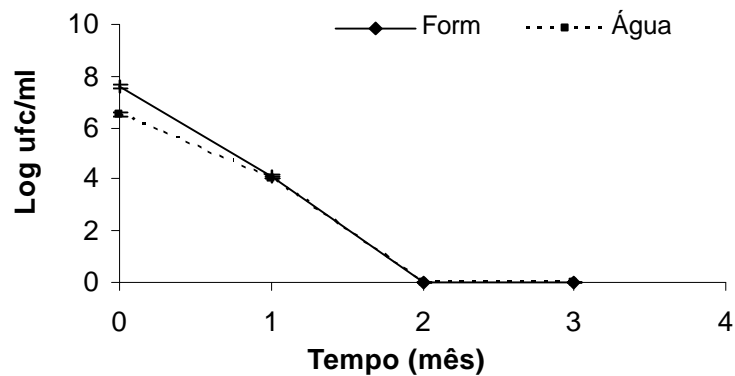


Figura 5 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Novosphingobium capsulatum*, no secante fubá de milho, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

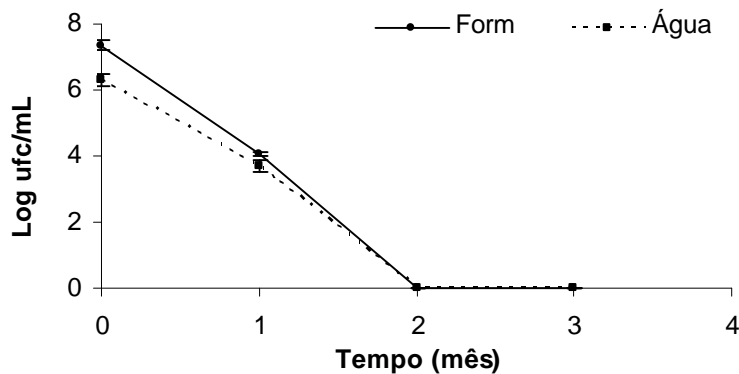


Figura 6 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Novosphingobium capsulatum*, no secante sílica texturizada, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

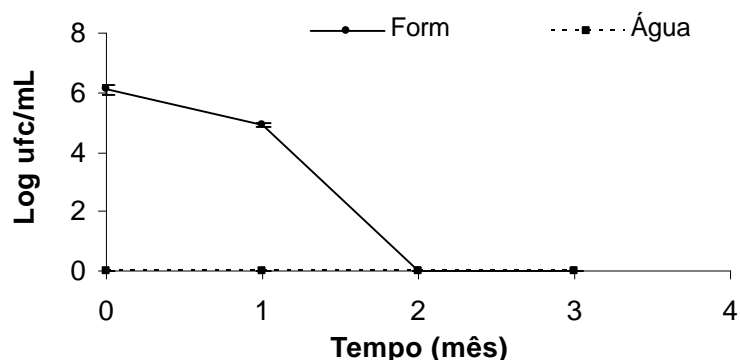


Figura 7 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Novosphingobium capsulatum*, no secante celulose triturada, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

Para *B. cereus*, em todos os secantes, sendo veiculado na formulação proposta ou em água, mais colônias foram recuperadas na avaliação inicial. Para o secante fubá de milho, quando veiculado na formulação, houve uma redução de ufc/mL no segundo mês em relação ao primeiro mês e, nos meses subsequentes, não houve crescimento de colônias bacterianas nas placas. Já quando em água, observou-se o crescimento de colônias até a terceira avaliação, indicando que foi possível recuperar o antagonista por até três meses após sua deposição secante (Figura 8). Na sílica texturizada, o antagonista comportou-se de forma semelhante ao no secante anterior, com declínio do número de ufc/mL a cada mês, porém, foi possível observar o crescimento de colônias em placas, quando veiculado na formulação proposta e em água até o terceiro mês (Figura 9). Já em celulose, para todas as avaliações, exceto a primeira não se observou o crescimento de colônias (Figura 10).

Para *P. putida*, com exceção do secante fubá de milho na primeira avaliação, não foi observado o surgimento de colônias bacterianas em nenhuma das avaliações (Figura 11).

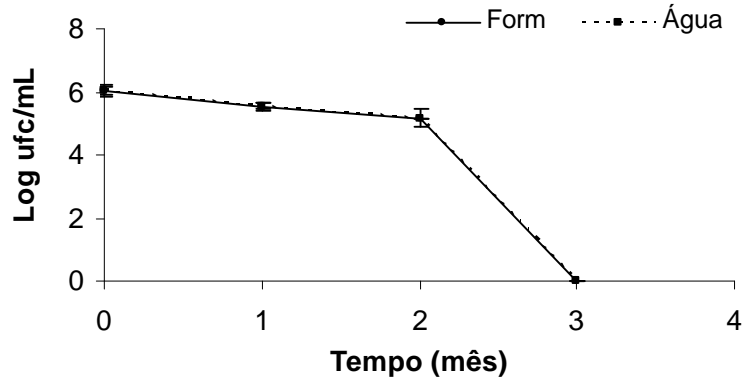


Figura 8 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Bacillus cereus*, no secante fubá de milho, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

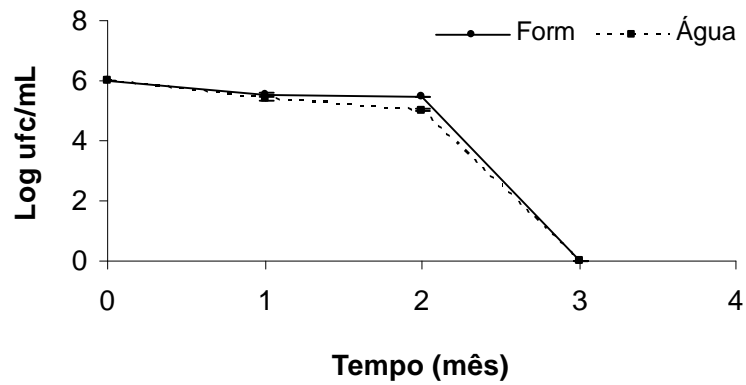


Figura 9 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Bacillus cereus*, no secante sílica texturizada, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

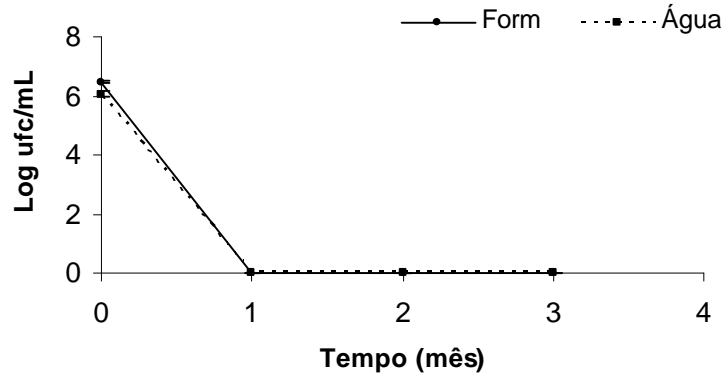


Figura 10 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Bacillus cereus*, no secante celulose triturada, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

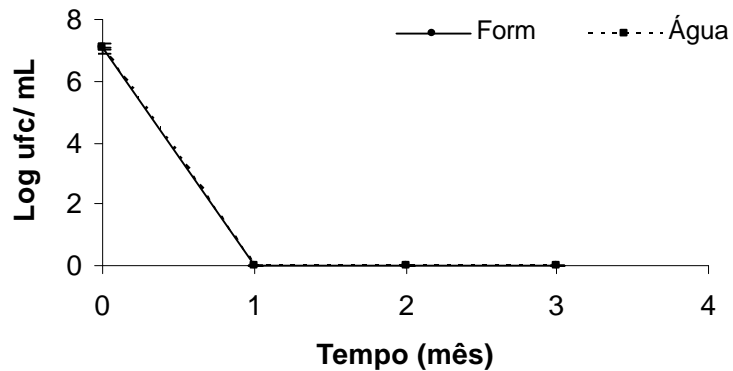


Figura 11 – Avaliação da sobrevivência do antagonista *Pseudomonas putida*, no secante fubá de milho, em um período de três meses, quando veiculado na formulação idealizada e em água.

O isolamento de *B. cereus* foi o que teve uma tendência a sobreviver um pouco melhor que os outros dois procariotas avaliados nesse ensaio. Embora sendo o antagonista que teve o menor número de ufc/mL inicial, foi o que sobreviveu pelo maior período de tempo nos secantes fubá de milho e sílica texturizada. Porém nenhum, dos antagonistas sobreviveu bem. A vida de prateleira é uma característica crucial para a viabilidade de uma formulação.

Segundo Bashan (1998) e Medugno (1995) uma formulação com vida de prateleira inferior a 18 meses é crítica para a industrialização.

Deve-se levar em consideração a eficiência desse ensaio na recuperação de células dos procariontes que foram dispensados nos secantes e demonstrar o que realmente ocorreu. É possível que nesse ensaio não tenha sido recuperado todas as células que foram dispensadas, já que estas poderiam estar aderidas às partículas do secante, semelhante ao que ocorre com microrganismos em partículas de solo (Chow *et al.*, 2002). Madigan *et al.* (2003) citam que, para estudos ecológicos de alguns microrganismos, métodos baseados em cultivos não são os mais adequados, uma vez que necessitam da viabilidade dos microrganismos e da eficiência em sua recuperação. Algumas técnicas que não se baseiam em cultivos de microrganismos são sugeridas por Lukow *et al.* (2000), Madigan *et al.* (2003) e Tótola & Chaer (2002), para esses estudos, tais como corantes que diferenciam células mortas de células vivas, GFP, T-RFLP & DGGE. Há também a possibilidade das células bacterianas estarem viáveis, mas não cultiváveis. Alguns autores têm considerado que alterações de fatores de crescimento como exposição à radiação solar, dentre outras causas, tem levado alguns isolamentos bacterianos que eram anteriormente viáveis e cultiváveis a tornarem-se viáveis, mas não cultiváveis (Besnard *et al.*, 2000; Besnard *et al.*, 2002; Effendi & Austin, 1995; Ghezzi & Steck, 1999; Hase *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2000). Possivelmente isso teria ocorrido nesse ensaio, quando os propágulos dos antagonistas foram depositados nos secantes pode ter ocorrido um estresse que levou as células a essa condição de viável, mas não cultivável. Também há de se ponderar a possibilidade de as células terem simplesmente morrido ao longo do ensaio.

4.3 – EFETIVIDADE DE CINCO FORMULAÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PARTE AÉREA DO TOMATEIRO EM CASA DE VEGETAÇÃO.

A análise do índice de severidade de mancha foliar causada por *C. cassiicola* pelo índice “Ecorin”, demonstrou que, em média, apenas os antagonistas *P. putida* e *B. cereus*, quando veiculados na formulação ISR 2000 e em água respectivamente tiveram severidade de doença maior que o tratamento controle água. Para *P. putida*, quando veiculada na formulação proposta, a severidade de doença foi reduzida em relação quando era formulada em ISR 2000. Porém quando comparada com água e/ou Agromil-Raiz, foi estatisticamente igual no controle da doença (Figura 12). Quando carregado pela formulação proposta, o antagonista é mais eficiente em controlar a severidade da doença, que o isolamento de *N. capsulatum* (Figura 13). Para autores como Amer & Utkhede, (2000), Bashan (1998) e Medugno (1995), as formulações de microrganismos agentes de biocontrole têm certa especificidade para cada antagonista.

No caso do controle da mancha foliar incitada por *C. cassiicola*, utilizando a formulação proposta, os resultados estão de acordo com o que esses autores propõem, o controle teve maior eficiência para o isolamento de *P. putida*.

O isolamento de *B. cereus* proporcionou o melhor controle da doença, quando veiculado na formulação proposta e em Agromil-Raiz, não diferindo estatisticamente uma da outra (Figura 14). Para esse antagonista no controle da mancha foliar (*C. cassiicola*), teve efeito entre formular e não formular. Para o antagonista *N. capsulatum*, não houve diferença estatística na redução de severidade de doença para nenhum dos carreadores utilizados (Figura 15).

No controle da pinta bacteriana do tomateiro (*P. syringae* pv. *tomato*), nenhum dos tratamentos foi estatisticamente eficientes em controlar o patógeno em relação ao tratamento controle. Nesse ensaio, a formulação a proposta comportou-se de maneira semelhante, independente do microrganismo que estava sendo carregado, diferindo do que foi proposto por Amer & Utkhede, (2000), Bashan (1998) e Medugno (1995).

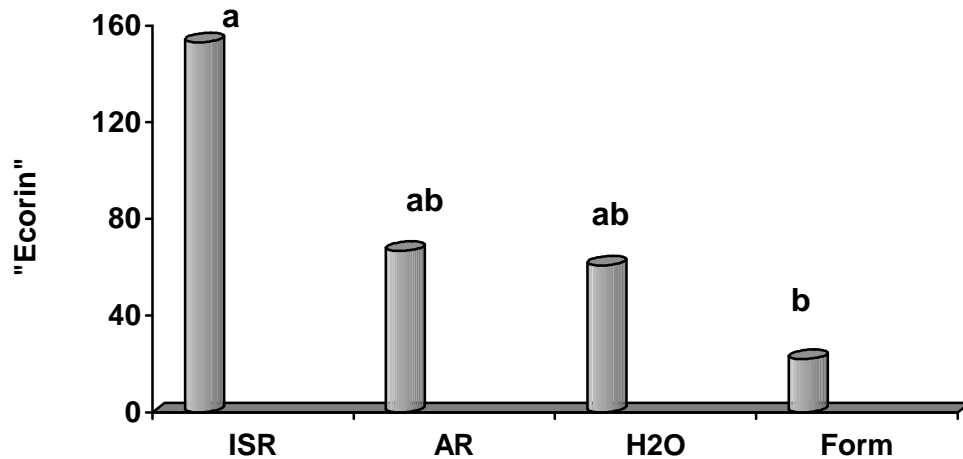


Figura 12 - Eficiência do isolamento *Pseudomonas putida* em reduzir a severidade da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), quando veiculado em água e nas quatro formulações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. "Ecorin" = eficiência na redução de severidade do fungo *C. cassiicola*. ISR = ISR 2000, AR = Agromil-Raiz e Form = Formulação proposta.

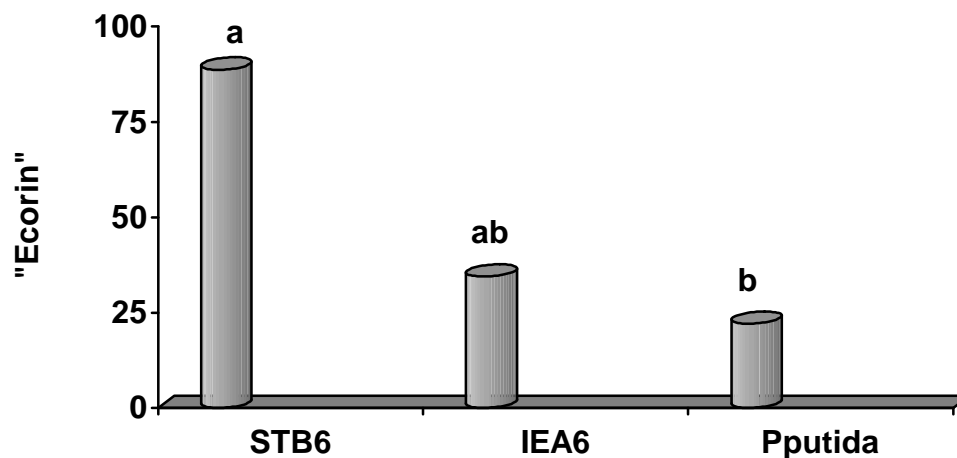


Figura 13 – Comparação da eficiência dos três antagonistas em reduzir a severidade da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), quando veiculado na formulação idealizada. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. "Ecorin" = eficiência na redução de severidade do fungo *C. cassiicola*. STB6 = *Novosphingobium capsulatum*, IEA6 = *Bacillus cereus* e Pputida = *Pseudomonas putida*.

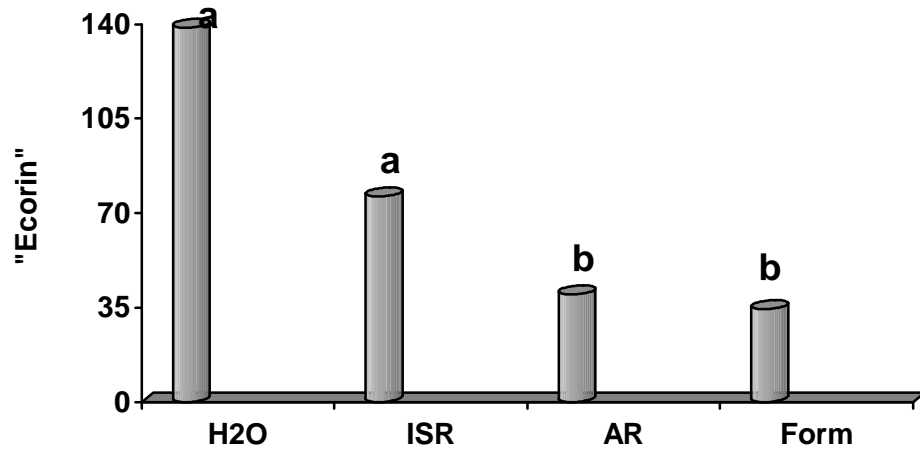


Figura 14 - Eficiência do isolamento *Bacillus cereus* em reduzir a severidade da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), quando veiculado em água e nas quatro formulações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. "Ecorin" = eficiência na redução de severidade do fungo *C. cassiicola*. ISR = ISR 2000, AR = Agromil-Raiz e Form = Formulação proposta.

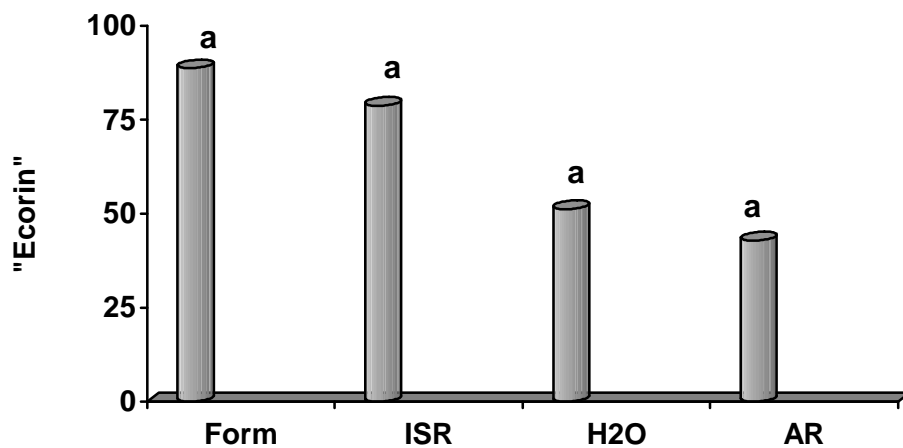


Figura 15 - Eficiência do isolamento *Novosphingobium capsulatum* em reduzir a severidade da mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), quando veiculado em água e nas quatro formulações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. "Ecorin" = eficiência na redução de severidade do fungo *C. cassiicola*. ISR = ISR 2000, AR = Agromil-Raiz e Form = Formulação proposta.

No experimento com oídio, apenas o antagonista *B. cereus*, na formulação ISR 2000, foi em média menos eficiente no controle da doença em comparação com o tratamento água, quando carregado em água, na formulação proposta e em Agromil-Raiz, foi estatisticamente igual ao tratamento controle (Figura 17). O isolamento de *P. putida*, estatisticamente, teve o mesmo efeito no controle da doença quando veiculado em água e nas três formulações (Figura 16), não diferindo esses tratamentos do controle. O controle de oídio pelo antagonista *N. capsulatum*, foi estatisticamente igual para todos os tratamentos. (Figura 18).

No presente trabalho, a abordagem do controle de doenças por formulações de antagonistas deu-se de forma um pouco diferente que na maioria dos trabalhos que envolvem esse tema (Amer & Utkhede, 2000; Chiou & Wu, 2003; Janisiewicz & Jeffers, 1997; Moënne-Loccoz *et al.*, 1999; Sabaratnam & Traquair, 2002; Slininger *et al.*, 1996; Vidhyasekaran *et al.*, 1997a; Vidhyasekaran *et al.*, 1997b; Xi *et al.*, 1996;). Em geral, nesses trabalhos, os autores partem do pré-suposto que os microrganismos veiculados em formulações são mais eficientes no controle de fitodoeças que quando veiculados em água. Na grande maioria dos artigos não há ensaios testando essa hipótese. No presente trabalho as quatro formulações utilizadas foram testadas quanto à sua eficiência como carreadores de microrganismos antagonistas, em reduzir a severidade de doença em relação aos mesmos antagonistas em água. Os resultados mostram que, para as condições testadas nesse trabalho, em sempre o antagonista terá maior eficiência quando formulado. O que foi observado é que, para a grande parte dos tratamentos aqui testados, as formulações proporcionaram controle das doenças, embora em alguns casos tenha sido igual ou menos eficiente que o tratamento controle. Porém, deve-se ponderar que estes foram estudos iniciais sobre a utilização de Agromil-Raiz e ISR 2000 e da formulação proposta como carreadores dos antagonistas. A formulação de antagonistas é necessária afim de que estes possam ser utilizados pelo agricultor no controle de doenças. No presente trabalho, as formulações não obtiveram a eficiência desejada no controle de doenças, embora proporcionasse a melhora no controle para algumas situações, como no controle de *C. cassiicola* pelos antagonistas *P. putida* e *B. cereus*. A falta de experiência no desenvolvimento de formulações

pode ser fator crucial no desenvolvimento de produtos de biocontrole por isso, parcerias com empresas que já tenham experiência e tecnologia no desenvolvimento de formulações devem ser firmadas afim de que promissores antagonistas possam ser utilizados de forma comercial.

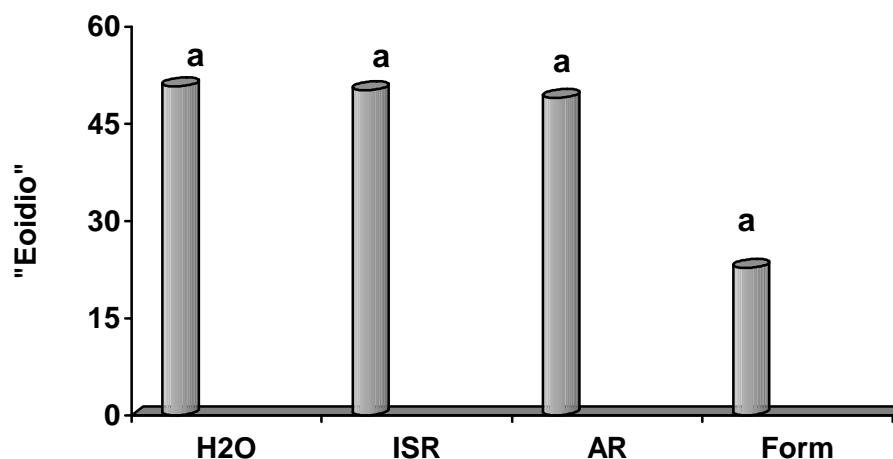


Figura 16 - Eficiência do isolamento *Pseudomonas putida* em reduzir a severidade oidio, quando veiculado em água, e nas quatro formulações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. "Eoidio" = eficiência na redução de severidade de oidio. ISR = ISR 2000, AR = Agromil-Raiz e Form = Formulação proposta.

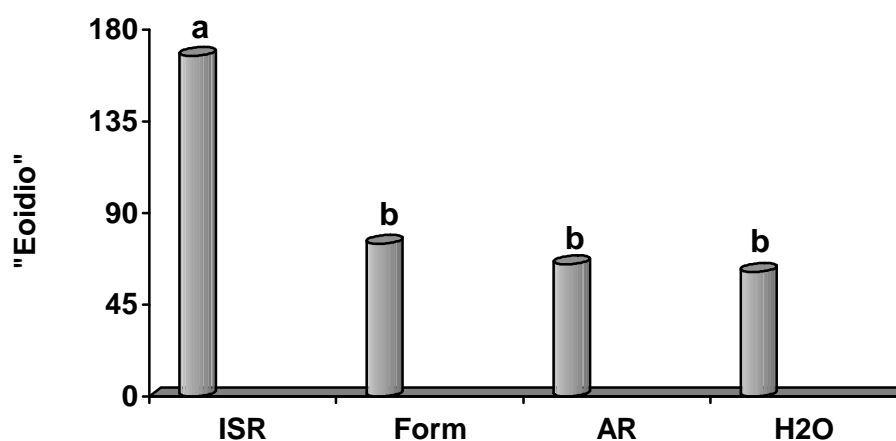


Figura 17 – Comparação da eficiência do isolamento *Bacillus cereus* em reduzir a severidade de oidio, quando veiculado em água e nas quatro formulações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. "Eoidio" = eficiência na redução de severidade de oidio. ISR = ISR 2000, AR = Agromil-Raiz e Form = Formulação proposta.

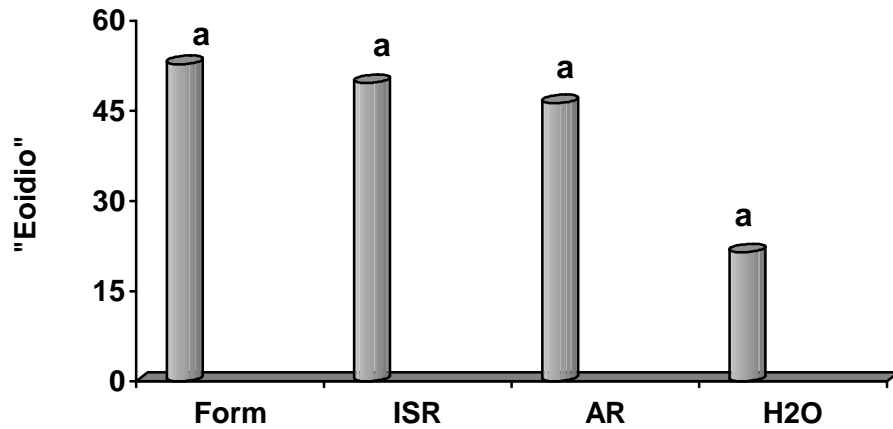


Figura 18 – Eficiência do isolamento *Novosphingobium capsulatum* em reduzir a severidade de oídio, quando veiculado em água e nas quatro formulações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. “Eoidio” = eficiência na redução de severidade de oídio. ISR = ISR 2000, AR = Agromil-Raiz e Form = Formulação proposta.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. 1997. 4ed. Plant Pathology. ed.: New York: Academic Press. 635p.

AMER, G. A. & UTKHEDE, R. S. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root of lettuce and cucumber. Can. J. Microbiol., 46 809.

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

BARGABUS, R. L.; ZIDACK, J. E.; SHERWOOD, J. E. & JACOBSEN, B. J. 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. Physiological and molecular plant pathology, 61 289.

BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances, 16 (4): 729.

BEATTIE, G. A. & LINDOW, S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology, 89 (5): 353.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L., 1995 Manual de fitopatologia. 3 ed. São Paulo. 919p.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M. & CAPPELIER, J. M. 2000. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiology*, 17 (6): 697.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; DECLERQ, E. & CAPPELIER, J. M. 2002. Environment and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research*, 33 (4): 359.

BETTIOL, W. E. E. 1991. Controle biológico de doenças de plantas. ed.: EMBRAPA. 388p.

BRAUN-KIEWNICK, A.; JACOBSEN, J. & SANDS, D. C. 2000. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*, 90 (4): 368.

BURR, T. J.; SCHROTH, M. N. & SUSLOW, T. 1978. Increased potato yield by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 68(9) 1377.

CAPDEVILLE, G.; WILSON, C. L.; BEER, S. V. & AIST, J. R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested "Red Delicious" apple fruit. *Phytopathology*, 92 (8): 900.

CARRER FILHO, R. 2002. Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomatario. 78 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais.

CHANWAY, C. P. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *For sci*, 43 (1): 99.

CHIOU, A. L. & WU, W. S. 2003. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of lily grey mold (*Botrytis elliptica*). *Journal Phytopathology*, 151 13.

CHOW, M. L.; RADOMSKI, C. C.; MCDERMONT, J. M.; DAVIES, J. & AXELROOD, P. E. 2002. Molecular characterization of bacteria diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiology Ecology*, 42 347.

CONNICK, W. J., JR.; LEWIS, J. A.; QUIMBY, P. C., JR.; BAKER, R. R. & DUNN, P. E. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. 1990. *New directions in biological control, alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Proceedings of a UCLA colloquium held at Frisco, Colorado, January 20 27, 1989.* 1990, 345 372; 92 ref.: Wiley-Liss Inc; New York; USA. p.

COOK, R. J. & BAKER, K. F. E. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Diseases.* ed.: Saint Paul: American Phytopathological Society. 539p.

COSTA, E.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; ATARÉS, E. & VIÑAS, I. 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbial Biotechnol*, 56 367.

EFFENDI, I. & AUSTIN, B. 1995. Dormant unculturable cells of the fish patogen *Aeromonas salmonicida*. *Microbial Ecology*, 30 (2): 183.

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

GASONI, L.; COZZI, J. & KOBAYASHI, K. 1998. Survival of potential biocontrol bacteria in various formulations and their ability to reduce radish damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. Journal of Plant Disease and Protection, 105 (1): 41.

GHEZZI, J. I. & STECK, T. R. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. FEMS Microbial Ecology, 30 (3): 203.

GISI, U.; CHIN, K. M.; KNAPOVA, G.; FÄRBER, R. K.; MOHR, U.; PARISI, S.; SIEROTZKI, H. & STEINFELD, U. 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Crop Protection, 19 (863-872).

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

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MENDONÇA, H. L. & MIZUBUTI, E. S. G. Eficiência de bactérias do filoplano no controle biológico de doenças foliares do tomateiro. 2002. Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, XXXV. Recife, PE - Brasil: Fitopatologia Brasileira. 04-09/08/2002. S183 - S184 p.

HASE, C.; HOTTINGER, M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. & DEFAGO, G. 2000. Survival and cell culturability of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the rhizosphere of cucumber grown in two soils of contrasting fertility status. Biology and Fertility of soils, 32 (3): 217.

ISHII, H.; FRAAIJIE, B. A.; SUGIYAMA, T.; NOGUCHI, K.; NISHIMURA, K.; TAKEDA, T.; AMANO, T. & HOLLOMON, D. W. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobirulin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91 (12): 1166.

JANISIEWICZ, W. J. & JEFFERS, S. N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, 16 (7): 629.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E. & ZITTER, T. A. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. ed.: APS press. 73p.

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

KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. 1978. "In promoting rhizobacteria on radishes". *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact.*: Angers, 1978, pp. 879-882.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. & MILLER, T. D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting Rhizobacteria *Pseudomonas* spp. on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70 (11): 1078.

KÖLLER, W. & WILCOX, W. F. 2001. Evidence for the predisposition of fungicide-resistance isolates of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. *Phytopathology*, 91 (8): 776.

KRISHNAMURTHY, K. & GNANAMANICKAM, S. S. 1998. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: Evaluation of a marker gene and formulations. *Biological Control*, 13 (3): 158.

LINDOW, S. E. & BRADL, M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 1875.

LOPES, C. A. & SANTOS, J. R. M. 1994. Doenças do tomateiro. ed.: EMBRAPA-CNPQ. 61p.

LUKOW, T.; DUNFIELD, P. F. & LIESACK, W. 2000. Use of the T-RFLP, technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 32 241.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. & PARKER, J. 2003. Ed. Brock Biology of Microorganisms. ed.: Englewood Cliffs: Prentice Hall Inc. 1072p.

MASCHER, F.; HASE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. & DEFAGO, G. 2000. The viable but non-culturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO does not promote strain persistence in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4): 1662.

MEDUGNO, C. C. 1995. Formulação de agentes microbianos para o controle de fitopatógenos. In: I. S. Melo & R. M. V. Sanhueza (Ed.). Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPQ. 47.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/estatisticas/culturas/2.2.a.xls>. 10 DE JUNHO DE 2004.

MOËNNE-LOCCOZ, Y.; NAUGHTON, M.; HIGGINS, P.; POWELL, J.; O'CONNOR, B. & O'GARA, F. 1999. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Applied Microbiology*, 86 108.

MOURA, A. B. 1996. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. 167 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais - Brasil.

NEMEC, S.; DATNOFF, L. E. & STRANDBERG, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection*, 15 (8): 735.

PARLEVLIT, J. E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 17 203.

ROMEIRO, R. S. 1995. *Bactérias Fitopatogênicas*. ed.: 367p.

ROMEIRO, R. S. 1999. *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*. ed.: Editora UFV. 45p.

ROMEIRO, R. S. 2001. *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. ed.: Editora UFV. 279p.

ROMEIRO, R. S. ISR-SAR: Pesquisa com procariotas para indução de resistência em plantas a patógenos, na Universidade Federal de Viçosa. 2002. I Simpósio de biologia molecular da resistência de plantas a patógenos: aplicações no manejo integrado de fitodoeças. Lavras, MG - Brasil: Editora UFLA. 06 a 10/05/2002. 87-119 p.

ROMEIRO, R. S. & GARCIA, F. A. O. 2003. Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. In: W. C. Luz; J. M. Fernandes; A. M. Prestes & E. C. Picinini (Ed.). *Revisão anual de patologia de plantas*. Passo Fundo: RAPP. 11: 195-227.

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

SABARATNAM, S. & TRAQUAIR, J. A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23 (3): 245.

SHARMA, V. K. & NOWAK, J. 1998. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology*, 44 (6): 528.

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

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD VIEIRA, B. A.; PEREIR, M. C. B. & MOUNTEER, A. 2004. Rhizobacteria induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29 288.

SLININGER, J. P.; VAN CAUWENBERGE, J. E.; BOTHAST, R. J.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. & COOK, R. J. 1996. Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Applied Microbiol Biotechnol*, 45 391.

STEDDOM, K. & MENGE, J. A. 2001. Evaluation of continuous application technology for delivery of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal. *Plant Disease*, 85 (4): 387.

STEDDOM, K.; MENGE, J. A.; CROWLEY, D. & BORNEMAM, J. 2002. Effect of repetitive applications of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal on citrus soil microbial communities. *Phytopathology*, 92 (8): 857.

STOCKWELL, V. O.; JOHNSON, K. B. & LOPER, J. E. 1998. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. *Phytopathology*, 88 (6): 506.

TÓTOLA, M. R. & CHAER, G. M. 2002. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. Tópicos em Ciência do Solo, 2 196.

VIDHYASEKARAN, P.; RABINDRAN, R.; MUTHAMILAN, M.; NAYAR, K.; RAJAPPAN, K.; SUBRAMANIAN, N. & VASUMATHI, K. 1997. Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for the control of rice blast. Plant Pathology, 46 291.

VIDHYASEKARAN, P.; SETHURAMAN, K.; RAJAPPAN, K. & VASUMATHI, K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. Biol control, 8 (3): 166.

WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; JONES, P. J. J. B. & CUPPLES, D. A. 2002. Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at locations in north america. Phytopathology, 92 (12): 1284.

WULFF, N. A. & PASCHOLATI, S. F. 1998. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Scientia Agricola, 24 428.

XI, K.; STEPHENS, J. H. G. & VERMA, P. R. 1996. Application of formulated rhizobacteria against root rot of field pea. Plant Pathology, 45 (6): 1150.

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E.; BORNEMAN, J. & KEEN, N. T. 2000. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (7): 3889.