

HÉLVIO GLEDSON MACIEL FERRAZ

**RIZOBACTÉRIAS E ÁCIDO JASMÔNICO NO CONTROLE 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

F381r
2012

Ferraz, Hélio Gledson Maciel, 1980-

Rizobactérias e ácido jasmônico no controle de doenças do
tomateiro / Hélio Gledson Maciel Ferraz. – Viçosa, MG,
2012.

xi, 77f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Pragas - Controle biológico. 2. Murcha-de-Fusarium.
3. Mancha-bacteriana. 4. Pinta-preta. 5. Tomate - Doenças e
pragas - Controle biológico. 6. Indução enzimática.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632

HÉLVIO GLEDSON MACIEL FERRAZ

**RIZOBACTÉRIAS E ÁCIDO JASMÔNICO NO CONTROLE 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2012.

Flávio Augusto de Oliveira Garcia

Renata Sousa Resende

Olinto Liparini Pereira

Fabício de Ávila Rodrigues
(Coorientador)

José Rogério de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, Izabel Maciel Ferraz e Helvio
Gonçalves Azevedo (*in memoriam*).

Aos meus irmãos, Érica, Aline e Bruno.

Aos meus tios, Erly e Eliana Azevedo.

À minha avó, Erozina.

Ao professor Reginaldo Romeiro (*in memoriam*),
com todo o carinho, dedico este humilde trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, paz e por ouvir minhas preces nos momentos difíceis.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudos de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado.

À minha mãe e à minha avó (*in memoriam*), pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

Aos meus tios, Erly e Eliana Azevedo, por todo carinho, pela atenção e pelo apoio.

A todos os meus familiares, em especial, à minha irmã, Érica e aos meus primos, Guilherme, Tiago e Priscila, pela amizade e pelo carinho.

Ao amigo, orientador e incentivador, professor Reginaldo da Silva Romeiro (*in memoriam*), por me iniciar nos trabalhos com controle biológico de doenças em plantas e com seu exemplo de luta por viver, me ensinar que devemos viver cada dia como se fosse o último. Agradeço por tudo, grande mestre.

Ao professor José Rogério, que encarou a missão de me orientar. Sempre muito prestativo e solícito a me ajudar nas minhas dúvidas. Agradeço professor, pela paciência e, principalmente, pela amizade!

Ao meu coorientador professor Fabrício, por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvida e pela amizade. Sua ajuda foi fundamental nos experimentos de análises enzimáticas. Os meus sinceros agradecimentos!

Ao professor Luis Cláudio, pelas sugestões nos meus experimentos de tese e pela paciência em atender às minhas dúvidas.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFV, Lívio, Elisângela, Poliana, Gilcianny, Patrícia, Camila e Antônio, pela companhia e pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa.

Agradecimento especial à estudante de mestrado, Patrícia Silveira, pela ajuda nos experimentos de análise enzimática. E aos estudantes de Iniciação Científica, Elisângela Milagres e Poliana Coutinho, pela preciosa ajuda na execução dos experimentos e pelo desafio de servir-lhes de exemplo.

Aos colegas do Laboratório de Interação Planta-Patógeno, pela ajuda nos experimentos de análises enzimáticas, especialmente à Dr^a Renata e aos estudantes de mestrado, Jonas e Wiler.

Aos estudantes de doutorado do Departamento de Fitopatologia, Alexandre Capucho, Henrique Duarte, Paulo Afonso e Hugo Medeiros, pelas sugestões e pela ajuda nos experimentos.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos prestados, com muita dedicação e presteza.

A todos os funcionários da UFV, em especial, ao Bruno, laboratorista do Laboratório de Interação Planta-Patógeno e à laboratorista, Maria Sueli, do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, pela ajuda na execução dos experimentos, pela paciência e pela amizade.

À Mariana, pelo carinho, pela paciência e pelo amor.

A todas as pessoas que porventura não estejam aqui citadas nominalmente e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

HÉLVIO GLEDSON MACIEL FERRAZ, filho de Hélio Gonçalves Azevedo e Izabel Maciel Ferraz, nasceu na capital de Minas Gerais, Belo Horizonte, em 19 de agosto de 1980.

Em 2001, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, graduando-se em Engenharia Agrônômica, em outubro de 2006.

Em março de 2007, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, na área de concentração em Bacteriologia de Plantas, sob a orientação do professor Reginaldo da Silva Romeiro, obtendo o título de Mestre em julho de 2008.

Em agosto desse mesmo ano, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Doutorado, submetendo à defesa de tese em 27 de julho de 2012.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Isolamento e seleção de rizobactérias visando o biocontrole de doenças do tomateiro	1
Resumo.....	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Material e métodos	5
2.1. Microrganismos patogênicos origem, cultivo e preservação	5
2.2. Origem, isolamento, cultivo e preservação dos agentes de controle biológico	6
2.3. Aplicação dos antagonistas em tomateiro	7
2.4. Inoculação com <i>X. gardneri</i> e avaliação da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato esterilizado .	8
2.5. Inoculação com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e avaliação da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato esterilizado.....	8
2.6. Seleção massal	9
2.7. Inoculação com <i>X. gardneri</i> e avaliação da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado	9
2.8. Inoculação com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e avaliação da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado.....	10
2.9. Inoculação com <i>A. solani</i> e avaliação da severidade da pinta-preta do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado.....	10
2.10. Bioensaio de colonização de raízes.....	11
3. Resultados	12
3.1. Isolamento das rizobactérias totais, bactérias endosporogênicas e actinomicetos	12
3.2. Seleção massal	15
3.3. Bioensaio dos antagonistas selecionados em promover o controle da mancha-bacteriana, murcha-de-fusário e da pinta-preta em plantas de tomateiro cultivadas em substrato não esterilizado	18
3.4. Bioensaio de colonização de raízes.....	20

	Página
4. Discussão	22
5. Referências bibliográficas	25
Rizobactérias e ácido jasmônico na redução dos sintomas de doenças do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa	31
Resumo.....	31
Abstract	32
1. Introdução	33
2. Material e métodos	35
2.1. Origem dos microrganismos, cultivo e preservação	35
2.2. Aplicação dos antagonistas e pulverização com ácido jasmônico em plantas de tomateiro	36
2.3. Crescimento das plantas de tomateiro.....	36
2.4. Inoculação das plantas de tomateiro com <i>X. gardneri</i> e avaliação da severidade da mancha-bacteriana	37
2.5. Inoculação das plantas de tomateiro com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e avaliação da severidade da murcha-de-fusário	38
2.6. Inoculação das plantas de tomateiro com <i>A. solani</i> e avaliação da severidade da pinta-preta	38
2.7. Determinação da atividade de enzimas de defesa e da concentração de aldeído malônico	39
2.8. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	42
3. Resultados	43
3.1. Patossistema tomateiro - <i>X. gardneri</i>	43
3.2. Patossistema tomateiro- <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	48
3.3. Patossistema tomateiro - <i>A. solani</i>	56
4. Discussão	65
5. Referências bibliográficas	71

RESUMO

FERRAZ, Hélvio Gledson Maciel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Rizobactérias e ácido jasmônico no controle de doenças do tomateiro.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Coorientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Foram isoladas bactérias da rizosfera de plantas-escape ou apresentando baixa severidade de doenças em cultivo de tomateiro convencional e orgânico, de floresta de eucalipto e de floresta nativa. Utilizando metodologias para o isolamento de actinomicetos e de rizobactérias totais e endosporogênicas foram obtidos um total de 635 isolados bacterianos, sendo 590 obtidos no presente trabalho e 45 selecionados em outros trabalhos. Sementes de tomate foram microbiolizadas com suspensão bacteriana de cada um dos isolados. Vinte e nove isolados (4,56%) foram capazes de reduzir as doenças do tomateiro causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) e *Xanthomonas gardneri* (*Xg*) em 50% ou mais e em 60% ou mais, respectivamente em substrato esterilizado. No ensaio realizado em substrato não esterilizado, as plantas tratadas com os antagonistas foram novamente desafiadas contra *Xg* e *Fol* e também foi testado se os isolados seriam eficientes no biocontrole do fungo *Alternaria solani* (*As*). No ensaio realizado em solo não esterilizado, os antagonistas foram dispensados no tomateiro por microbiolização de sementes e encharcamento de solo cinco dias antes da inoculação com o patógeno desafiante. Alguns isolados não foram eficientes em promover o biocontrole da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário em solo não esterilizado. Quinze dos isolados selecionados contra *Xg* e *Fol* também foram eficientes no biocontrole da pinta-preta. Todos os 29 isolados foram capazes de colonizar o sistema radicular das plântulas de tomateiro. Os três isolados que mais reduziram as severidades de *Fol*, *Xg* e *As*, em percentagem média, foram os isolados UFV252 (não identificado), UFV618 (*Streptomyces setonii*) e UFV592 (*Bacillus cereus*) em 47,91, 46,32 e 42,02%, respectivamente. Esses três isolados e o ácido jasmônico (AJ) foram testados contra *Xg*, *Fol* e *As* e na atividade de enzimas de defesa: β -1,3-glucanases (GLU), quitinases (QUI), peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), lipoxigenases (LOX) e fenilalanina amônia-liases (FAL), além da concentração de aldeído malônico (MDA). Os isolados foram aplicados nas plantas por microbiolização de sementes e também por encharcamento de solo cinco dias antes da inoculação dos patógenos desafiantes e o AJ foi pulverizado nas plantas

48 horas antes da inoculação. Mesmo nas plantas não inoculadas, os tratamentos tiveram maior atividade de algumas enzimas em relação ao tratamento-controle não inoculado. Esses resultados sugerem que as rizobactérias podem estar induzindo resistência sistêmica no tomateiro, uma vez que mesmo na ausência do patógeno ocorreu aumento na atividade enzimática. No patossistema tomateiro-*Xg* as maiores atividades das enzimas de defesa nas plantas inoculadas com *Xg* em comparação ao controle que resultaram em menor severidade da mancha-bacteriana foram: QUI e LOX, para o tratamento UFV618; PPO, QUI e LOX, para os tratamentos UFV592 e UFV252; e GLU, QUI, POX, PPO e FAL, para o tratamento AJ. Para o patossistema tomateiro-*Fol*, as maiores atividades das enzimas de defesa nas plantas inoculadas com *Fol* em comparação ao controle, que resultaram em menor severidade da murcha-de-fusário foram as enzimas QUI e LOX, para os tratamentos UFV618; e UFV592, para o tratamento AJ. Além dessas enzimas houve aumento na atividade da POX e PAL. No tratamento UFV252 houve aumento na atividade das enzimas PFO, FAL e QUI. Já no patossistema tomateiro-*As* foi observado que não houve aumento da atividade de nenhuma enzima para o tratamento UFV618, entre as plantas inoculadas com *As* e o tratamento-controle; também não ocorreu redução da severidade da pinta-preta. Entretanto, no tratamento UFV592 houve aumento na atividade das enzimas QUI e FAL e no tratamento UFV252 ocorreu aumento na atividade da PFO e FAL. Além da PFO, QUI e FAL houve aumento na atividade LOX no tratamento AJ. A maior atividade dessas enzimas parece ter contribuído para a redução da severidade da pinta-preta pelos tratamentos UFV592, UFV252 e AJ. Em todos os patossistemas em pelo menos uma época de coleta a concentração de MDA foi maior no tratamento-controle, inoculado em comparação com os tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e AJ, indicando maior dano nas membranas no tratamento-controle, o que corrobora com os maiores valores de severidade observados nesse tratamento.

ABSTRACT

FERRAZ, Hélvio Gledson Maciel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Rhizobacteria and jasmonic acid in controlling tomato diseases.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: Fabrício de Ávila Rodrigues and Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Bacteria were isolated from the rhizosphere of plants escape or showing low disease severity in tomato cultivation of conventional and organic eucalyptus forest and native forest. Using methodologies for isolating actinomycetes, rhizobacterias, and endosporegenic bacterias. This gave a total of 635 bacterial isolates, 590 isolates were obtained in this study and 45 isolates were selected for further work. Tomato seeds were microbiolized with bacterial suspension of each isolate. Twenty-nine isolates (4.56%), were able to reduce the tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) and *Xanthomonas gardneri* (*Xg*) in 50% or more and 60% or more, respectively, in sterile substrates. In the assay accomplished in substrate unsterile, plants treated with the antagonists were again challenged against *Xg* and *Fol* and also tested whether these isolates would be effective in the biocontrol fungus *Alternaria solani* (*As*). In the test carried out in non-sterile soil, the antagonist were dispensed by microbiolization in tomato seeds and soil drenching, five days before inoculation with the pathogen challenging. Some isolates were effective in promoting the biocontrol of bacterial spot and fusarium wilt in unsterilized soil. Fifteen of selected isolates against *Xg* and *Fol* were also effective in biocontrol of early blight. All 29 isolates were able to colonizarar the root system of tomato seedlings. The three isolates that most reduced the severities of *Fol*, *Xg*, and *As*, average percentage, the isolates were UFV252 (unidentified), UFV618 (*Streptomyces setonii*) e UFV592 (*Bacillus cereus*) at 47.91, 46.32, and 42.02%, respectively. These three isolates and jasmonic acid (JA) were tested agains *Xg*, *Fol*, and *As* and activity of defense enzymes: β -1,3-glucanases (GLU), chitinases (CHI), peroxidases (POX), polyphenoloxidases (PPO), lipoxygenases (LOX), and phenylalanine ammonia lyase (PAL), in addition the concentration of malondialdehyde (MDA). The strains were applied in plants by seed microbiolization and also by soil drenching, five days before inoculation of challenging pathogens and the JA was sprayed on plants 48 h before inoculation. Even in non-inoculated plants treatments had higher activity of some enzymes in relation to the control

uninoculated. These results suggest that rhizobacteria may be inducing systemic resistance in tomato, since even in the absence of the pathogen caused an increase in enzyme activity. In pathosystem tomato-*Xg* the highest activities of defense enzymes in plants inoculated with *Xg* compared to the control that resulted in lower bacterial spot severity were: CHI and LOX for the treatment UFV618; PPO, CHI, and LOX for the treatments UFV592 and UFV252, and GLU, CHI, POX, PPO e PAL for the treatment JA. In pathosystem tomato - *Fol* the highest activities of defense enzymes in plants inoculated with *Fol* compared to the control, that resulted in lower fusarium wilt severity were the enzymes CHI and LOX for the treatments UFV618 and UFV592, for the treatment JA beyond these enzymes increased in activity of POX and PAL. In UFV252 treatment increased the activity of enzymes PPO, PAL e CHI. Already in the pathosystem tomato- *As* was noted that there was no increase in the activity of the enzyme for the UFV618 treatment, between inoculated plants with *As* and control treatment, there was also no reduction in severity of early blight. However, the UFV592 treatment was no increase in enzyme activity CHI and FAL, and UFV252 treatment occurred increase in PPO activity and FAL. Besides the PPO, CHI, and PAL there was an increase in LOX activity in JA treatment. The increased activity of these enzymes appears to have contributed to reducing the severity of early blight by UFV592, AJ, and UFV252 treatments. In all pathosystems at least one collection time the concentration of MDA in control treatment was higher in comparison to UFV618, UFV592, AJ, and UFV252 inoculated treatments. Indicating greater damage membranes in control treatment which corroborates with the highest severity observed in these treatments.

Isolamento e seleção de rizobactérias visando o biocontrole de doenças do tomateiro

Resumo: Um dos principais entraves nos experimentos de controle biológico de doenças em plantas por bactérias é o isolamento dos candidatos a antagonistas. Cerca de 0,1 a 1% das bactérias são cultiváveis em condições de laboratório e mesmo para as cultiváveis só as mais abundantes são isoladas, permitindo a obtenção em cultura pura. Buscando amostrar uma maior diversidade de candidatos a antagonistas, foram isoladas bactérias da rizosfera de plantas-escape ou apresentando baixa severidade de doenças em cultivo de tomateiro convencional e orgânico, de floresta de eucalipto e de mata nativa. Utilizando metodologias para o isolamento de actinomicetos e de rizobactérias totais e endosporogênicas foram obtidos um total de 635 isolados bacterianos, sendo 590 obtidos no presente trabalho e 45 foram selecionados em outros trabalhos. Sementes de tomate foram microbiolizadas com suspensão bacteriana de cada um dos isolados. Vinte e nove isolados, (4,56%) foram capazes de reduzir as doenças do tomateiro causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) e *Xanthomonas gardneri* (*Xg*) em 50% ou mais e em 60% ou mais, respectivamente em substrato esterilizado. Do total de rizobactérias isoladas da rizosfera de plantas de tomateiro, 4,52% foram selecionadas em plantio convencional e 2,44% em plantio orgânico. Na rizosfera de floresta nativa não foi selecionada nenhuma rizobactéria e na floresta de eucalipto foram selecionadas 10,52%. No ensaio em que as plantas de tomateiro foram cultivadas em substrato não esterilizado, as plantas foram novamente desafiadas contra *Xg* e *Fol* e também foi testado se os isolados seriam eficientes no biocontrole do fungo *Alternaria solani* (*As*). Os antagonistas foram dispensados no tomateiro por microbiolização de sementes e encharcamento de solo cinco dias antes da inoculação com o patógeno desafiante. Alguns isolados não foram eficientes em promover o biocontrole da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário em solo não esterilizado. Quinze dos isolados selecionados contra *Xg* e *Fol* também foram eficientes no biocontrole da pinta-preta. Todos os 29 isolados foram capazes de colonizar o sistema radicular das plântulas de tomateiro. Os três isolados que mais reduziram as severidades de *Fol*, *Xg* e *As*, em percentagem média, foram os isolados UFV-252 (não identificado), UFV-618 (*Streptomyces setonii*) e UFV-592 (*Bacillus cereus*), em 47,91, 46,32 e 42,02%, respectivamente. Entre os nove isolados mais eficientes contra os três patógenos, cinco são bactérias endosporogênicas e três são actinomicetos. Talvez por produzirem estruturas de resistência estes procariontes podem tolerar fatores ambientais adversos, mantendo um nível populacional adequado para exercer o controle biológico. Os resultados obtidos permitem concluir que: i) o isolamento de bactérias da rizosfera de plantas-escape ou apresentando baixa severidade de doenças em cultivo de tomateiro convencional e orgânico, de floresta de eucalipto e de mata nativa, utilizando metodologias para o isolamento de actinomicetos e de rizobactérias totais e endosporogênicas, foi eficiente para obtenção de antagonistas para o controle da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário; ii) nas plantas cultivadas em substrato esterilizado foram selecionadas 29 rizobactérias capazes de controlar tanto a mancha-bacteriana como a murcha-de-fusário; iii) alguns dos 29 isolados bacterianos selecionados não foram capazes de exercer o biocontrole em solo não esterilizado e 15 isolados foram eficientes no controle da pinta-preta; e v) todas as rizobactérias selecionadas foram capazes de colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro.

Isolation and screening of rhizobacteria for the control of multiple tomato diseases

Abstract: One of the main obstacles in the experiments of biological control of plant diseases by bacteria is the isolation of candidate antagonists. About 0.1 to 1% of the bacteria are cultivated in laboratory and even for culturable, only the most abundant are isolated allowing to obtain in pure culture. Seeking sample a greater diversity of candidates antagonists, bacteria were isolated from the rhizosphere of plants showing escape or low disease severity in growing conventional and organic tomato, forest of eucalyptus and native forest. Using methodologies for isolating actinomycetes, rhizobacteria, and endosporegenic bacteria. There was obtained a total of 635 bacterial isolates, 590 isolates were obtained in this study and 45 isolates were selected for further work. Tomato seeds were microbiolized with bacterial suspension of each isolate. Twenty-nine isolates, (4.56%) were able to reduce the tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) e *Xanthomonas gardneri* (*Xg*) or more and 60% or more, respectively in sterile substrates. Of the total rhizobacteria from rhizosphere of tomato plants, 4.52% were selected in conventional tillage and 2.44% in organic planting. Rhizosphere of native forest was not selected any rhizobacteria and eucalyptus forest were selected 10.52% of rhizobacteria. In the trial in which the tomato plants were grown in non-sterilized substrate, plants were again challenged against *Xg* and *Fol*, it was also tested if the isolates were effective in biocontrol fungus *Alternaria solani* (*As*). Antagonists were dispensed in tomato plants by seed microbiolization and soil drenching, five days before inoculation with the challenging pathogen. Some isolates were effective in promoting the biocontrol of bacterial spot and fusarium wilt in unsterilized soil. Fifteen of selected isolates against *Xg* and *Fol* were also effective in biocontrol of early blight. All 29 isolates were able to colonizarar the root system of tomato seedlings. The three isolates that most reduced the severities of *Fol*, *Xg*, and *As*, in average percentage, the isolates were UFV-252 (unidentified), UFV-618 (*Streptomyces setonii*), and UFV-592 (*Bacillus cereus*) in 47.91, 46.32, and 42.02%, respectively. Among the nine isolates efficient against the three pathogens, five are endosporegenic bacteria and three are actinomycetes. Maybe for producing resistance structures these prokaryotes can tolerate adverse environmental factors maintaining a population level suitable for biological control exercise. The results indicate that: i) the isolation of bacteria from the rhizosphere of plants escape or showing low disease severity in growing conventional and organic tomato, eucalyptus forest, and native forest, using methodologies for the isolation of actinomycetes, rhizobacteria, and endosporegenic bacteria was efficient for obtaining antagonists for the control of bacterial spot and fusarium wilt; ii) plants grown in sterilized substrate, 29 selected rhizobacteria were capable of controlling both bacterial spot and fusarium wilt; iii) some of the 29 bacterial isolates selected were not able to exert biocontrol in unsterilized soil and 15 isolates were efficient in controlling early blight; and v) all selected rhizobacteria were able to colonize the roots of tomato seedlings.

1. Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma olerícola pertencente à família *Solanaceae*, cultivada mundialmente (FIGUEIRA, 2000). O Brasil ocupa a oitava posição entre as nações que mais cultivam a hortaliça, com produção estimada em 3,69 milhões de toneladas, em uma área de 60,77 mil hectares (FAOSTAT, 2010).

A cultura do tomateiro é suscetível a mais de 200 doenças, tanto em pré como em pós-colheita (JONES *et al.*, 1991; LOPES; SANTOS, 1994; AGRIOS, 2005). Em virtude da alta vulnerabilidade da cultura a doenças, são grandes as quantidades de agrotóxicos empregados para o controle de várias dessas fitomoléstias (LOPES; SANTOS, 1994; KUROZAWA; PAVAN, 1997). Dentre os problemas oriundos do uso abusivo de agrotóxicos podem ser citadas a seleção de populações de microrganismos resistentes ao princípio ativo; a redução ou mesmo a eliminação da microbiota benéfica; a contaminação de aquíferos; e o longo tempo de persistência e permanência de alguns desses compostos no solo e, ou, em órgãos vegetais (ZAMBOLIM, 2001; CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003).

Grande quantidade de fungicida é despendida no controle da pinta-preta, cujo agente causal é o fungo *Alternaria solani* Sorauer (VALE *et al.*, 1992). Em pesquisa realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), amostras de tomate indicaram que os níveis de resíduos de agrotóxicos estavam bem acima do limite estabelecido pela legislação (ANVISA, 2008). Assim, a utilização de agentes de biocontrole combinado com outros métodos de controle de doenças pode ser uma alternativa viável para diminuir a quantidade de agrotóxicos empregada na cultura do tomateiro. Myresiotis *et al.* (2012) avaliaram a utilização do indutor de resistência acibenzolar S-metil, do fungicida hymexazol e do isolado de *Bacillus subtilis* GB03 para o manejo integrado da podridão-de-raízes e coroa-de-plantas de tomate, causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Os autores verificaram que as plantas tratadas com a combinação do isolado de *B. subtilis* GB03 e o fungicida proporcionaram controle superior ao controle do isolado GB03 e do hymexazol, aplicados separadamente

Para culturas em que não agrotóxicos registrados para o controle de doenças, ou naquelas em que os produtos registrados são pouco eficazes, como para a murcha-de-fusário e mancha-bacteriana, o controle biológico é uma estratégia potencial. Para a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *lycopersici*

(Sacc.) Snyder and Hansen há um produto registrado para a cultura do tomate, cujo ingrediente ativo é o metam-sódico, recomendado para o tratamento do solo em pré-plantio (AGROFIT, 2012). Para o complexo de bactérias que causam a mancha-bacteriana do tomateiro, a saber: *Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans* (Jones *et al.*, 2004), só há registros de produtos à base de cobre apenas para *X. vesicatoria* (AGROFIT, 2012). Para as demais espécies não há qualquer produto registrado.

Diversos microrganismos, como fungos (MUNOZ *et al.*, 2008), bactérias (MIZUBUTI *et al.*, 1995; HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004; ROMEIRO, 2007b) e leveduras (ZHAO *et al.*, 2008), têm sido utilizados experimentalmente no controle biológico de diversas fitomoléstias. As rizobactérias podem ser benéficas às plantas diretamente, promovendo o seu crescimento (FARAJZADEH *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2012) ou indiretamente, protegendo-as contra patógenos (THANH *et al.*, 2009; PATIL *et al.*, 2011; Myresiotis *et al.*, 2012). Entretanto, cerca de 0,1 a 1% das bactérias são cultiváveis em condições de laboratório, e mesmo para as cultiváveis, só as mais abundantes são isoladas, permitindo a obtenção em cultura pura (MADIGAN *et al.*, 2000). Possivelmente, bactérias que seriam eficientes no controle de doenças em plantas não são cultiváveis em condições de laboratório.

Para exercer seu efeito benéfico no ambiente radicular, as bactérias devem ser competentes na rizosfera, ou seja, devem colonizar as raízes e competir com outros microrganismos por nutrientes exsudados das plantas (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Procariotas produtores de esporos de resistência podem sobreviver no solo em condições adversas, o que lhes garantem vantagens competitivas em relação aos procariotas não produtores de esporos (HAMDALI *et al.*, 2008; SHANMUGAM *et al.*, 2011). Ademais, algumas bactérias endosporogênicas e actinomicetos têm sido estudados por promoverem o crescimento de plantas e o biocontrole, o que culmina com o aumento do rendimento das culturas (HAMDALI *et al.*, 2008; PATIL *et al.*, 2011). Bactérias endosporogênicas produzem estruturas de resistência, o que permite sua sobrevivência por longo período de tempo na ausência de plantas hospedeiras, em comparação com as bactérias não endosporogênicas, uma vez que endósporos são tidos como a estrutura biológica de maior resistência a fatores químicos e físicos (MADIGAN *et al.*, 2000). Adicionalmente, algumas bactérias endosporogênicas produzem substâncias antimicrobianas (DEMAIN; LANCINI, 2001), assim como podem induzir resistência em plantas (HALFELD-VIEIRA, 2002b;

SILVA *et al.*, 2004). Actinomicetos são bactérias filamentosas, despertando especial interesse na rizosfera, uma vez que são capazes de colonizar os tecidos das plantas e produzir esporos de resistência que sobrevivem por longo período de tempo em solos agrícolas (HAMDALI *et al.*, 2008).

O presente trabalho teve como objetivos: i) isolar bactérias da rizosfera de tomateiro convencional e orgânico e de outras culturas, utilizando técnicas para obtenção de actinomicetos e rizobactérias; ii) selecionar, dentre essas e também de antagonistas selecionados previamente, pertencentes à coleção do LBP da UFV, aqueles isolados capazes de reduzir a severidade a murcha-de-fusário e a mancha-bacteriana em tomateiro cultivado em solo esterilizado; iii) avaliar a capacidade dos microrganismos em inibir *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *X. gardneri* em solo não este-rilizado e testar os isolados selecionados no biocontrole da pinta-preta do tomateiro; e iv) verificar a capacidade dos isolados selecionados em colonizar o sistema radicular de plantas de tomateiro em bioensaio de colonização de raízes.

2. Material e métodos

2.1. Microrganismos patogênicos origem, cultivo e preservação

A bactéria patogênica *Xanthomonas gardneri* (*Xg*) ((ex Sutic 1957) Jones *et al.* (2006) foi obtida de tomateiro em uma lavoura comercial com sintomas de mancha-bacteriana no município de Coimbra, Minas Gerais, Brasil e identificada por meio do perfil de banda, gerado por BOX-PCR (LOUWS; FULBRIGHT *et al.*, 1995). Os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *lycopersici* (*Fol*) (Sacc.) Snyder and Hansen, raça 2 e *Alternaria solani* (*As*) Sorauer, foram obtidos da coleção de fungos da Clínica de Doenças de Plantas da UFV e da coleção de patógenos do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos da UFV, respectivamente. O isolado bacteriano foi cultivado em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e os fungos foram cultivados em BDA (Batata dextrose-ágar) (DHINGRA; SINCLAIR, 1985). Os microrganismos foram incorporados à coleção microbiana do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFV e preservados em glicerina (30%), com posterior armazenamento em ultrafreezer a -80 °C, para *Xg* (ROMEIRO, 2005) e em papel-filtro, para *Fol* e *As* (DHINGRA; SINCLAIR, 1985).

2.2. Origem, isolamento, cultivo e preservação dos agentes de controle biológico

Amostras de solo e raízes foram obtidas de várias culturas e regiões (Tabela 1) e de cada amostra foram isolados rizobactérias totais, bactérias endosporogênicas e actinomicetos. As amostras foram provenientes de plantios de tomate convencional e orgânico, floresta nativa e de floresta de eucalipto. Nas amostras oriundas de plantio de tomate, as amostras foram coletadas de plantas-escapes, sadias ou com baixa incidência de doenças. Para obtenção do lavado, adicionou-se 20 g de solo e raízes de cada uma das amostras em frascos contendo 200 mL de solução salina (0,85%) e Tween 80 (0,05%). Os frascos foram agitados a 200 rpm por 1 hora e depois sonificados por 20 min. Para o isolamento das rizobactérias totais foi realizada a diluição seriada fator 10, utilizando uma alíquota de 1 mL do lavado (ROMEIRO, 2007a). Alíquotas de 100 µL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-10}) foram espalhadas no meio sólido (15 g L⁻¹ de ágar) de Kado e Heskett (1970). Este meio contém sacarose (10 g L⁻¹), caseína ácida hidrolisada (8 g L⁻¹), extrato de levedura (4 g L⁻¹), K₂HPO₄ (2 g L⁻¹) e MnSO₄ (0,03 g L⁻¹); o pH foi ajustado para 7. Após 24 horas de incubação a 28 °C, colônias individuais com diferentes características morfológicas foram selecionadas e transferidas para tubos contendo o mesmo meio inclinado (ROMEIRO, 2007a). O método de Földes *et al.* (2000) foi adotado para o isolamento de bactérias formadoras de endósporo. Uma alíquota de 1 mL do lavado foi transferida para 15 mL do meio líquido de Finley e Fields (1962) para induzir a formação de endósporo. Este meio contém extrato de carne (3 g L⁻¹), peptona (1,9 g L⁻¹) e MnSO₄ (0,03 g L⁻¹); o pH foi ajustado para 7 (FINLEY; FIELDS, 1962). Depois de 72 horas de incubação, a 25 °C, sob agitação a 200 rpm, uma alíquota de 5 mL do meio foi aquecida a 80 °C, por 10 min, para inativar as células vegetativas. Uma alíquota de 1 mL foi utilizada na diluição seriada e de cada diluição (10^{-1} a 10^{-10}) foi espalhada uma alíquota de 100 µL em meio sólido (15 g L⁻¹ de ágar) de Finley e Fields. Após incubação por 48 horas, a 28 °C, colônias individuais, com diferentes características morfológicas foram selecionadas e transferidas para tubos contendo o mesmo meio. Para o isolamento dos actinomicetos foi utilizada a técnica de Williams e Davies (1965) com modificações. Uma alíquota de 5 mL do lavado foi aquecida a 80 °C, por 10 min, para inativar a maioria dos microrganismos não actinomicetos. Procedeu-se a diluição seriada e de cada diluição (10^{-1} a 10^{-10}) foi espalhada uma

alíquota de 100 μL em meio sólido (15 g L^{-1} de ágar) extrato de solo ágar (PRAMER; SCHMIDT, 1964) contendo cicloheximida (10 mg L^{-1}). O meio é composto por 100 mL de sobrenadante de infusão de solo (200 g de solo L^{-1} , fervido por 5 min e decantado por 15 min), glicose (1 g L^{-1}), K_2HPO_4 (0,5 g L^{-1}), KNO_3 (0,1 g L^{-1}) e pH ajustado para 7. Após incubação por 5 dias, a 30 °C, colônias de actinomicetos foram selecionadas e transferidas para tubos contendo o mesmo meio. As culturas bacterianas foram preservadas por longo prazo por meio de repicagens quadrimestrais, tubo a tubo, e mantidas a 4 °C em refrigerador.

2.3. Aplicação dos antagonistas em tomateiro

Os antagonistas foram aplicados nas plantas por microbiolização de sementes. Culturas de rizobactérias e actinomicetos com 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente foram usadas para microbiolizar as sementes de tomateiro (cultivar Santa Clara). A densidade ótica (DO_{540}) foi ajustada para 0,5 (aproximadamente 5×10^{10} UFC mL^{-1}), adicionando solução salina (0,85%) ao crescimento bacteriano. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 30 s e hipoclorito de sódio 2%, por 3 min; em seguida as sementes foram lavadas em água destilada. As sementes foram microbiolizadas com as suspensões de cada um dos isolados por 12 horas e em seguida, semeadas em vasos. O controle foi composto de sementes não micróbionizadas.

2.3. Produção das plantas de tomateiro

Os experimentos foram conduzidos em vasos de plástico com capacidade para 2 dm^3 de substrato. O substrato foi uma mistura de solo esterilizado, húmus e areia, na proporção 3:1:1 (v:v). Para cada dm^3 de substrato foi adicionado 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Sementes de tomateiro foram semeadas em número de seis sementes por vaso. Após emergência, foram deixadas duas plantas por vaso. Quinze dias após semeadura, as plantas de tomateiro em cada vaso receberam 100 mL de solução nutritiva, contendo em mg L^{-1} , 192 de KCl, 104,42 de K_2SO_4 , 150,35 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 61 de ureia, 0,27 de $\text{NH}_4\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,61 de H_3BO_3 , 6,67 de ZnSO_4 , 1,74 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4,10 de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4,08 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5,58 de EDTA bisódico. A solução também foi aplicada na segunda e terceira semana após

semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa de 75%) irrigadas diariamente.

Em decorrência do grande número de antagonistas a serem testados, a seleção foi realizada em seis ensaios, com 100 antagonistas testados em cada um e no último ensaio foram testados 135 isolados. Em cada ensaio sementes não microbiolizadas foram utilizadas como controle.

2.4. Inoculação com *X. gardneri* e avaliação da severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato esterilizado

Plantas com o quinto par de folhas completamente desenvolvidos foram atomizadas com uma suspensão de inóculo de *Xg* ($OD_{540} = 0,15$, aproximadamente 2×10^8 UFC mL⁻¹) com auxílio de atomizador De Vilbs nº 15. As plantas foram acondicionadas 24 horas antes e depois da inoculação em câmara úmida a 26 °C. Posteriormente, as plantas retornaram à casa de vegetação até o surgimento dos sintomas da doença. A severidade foi avaliada utilizando a escala diagramática proposta por Mello *et al.* (1997). Para avaliar a severidade da mancha-bacteriana, as plantas foram divididas em terços: inferior, médio e superior e em cada um dos terços, foi escolhida a folha com maior severidade. No final, foi feita uma média dos valores de severidade nas folhas dos três terços para as duas plantas da repetição de cada tratamento.

2.5. Inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e avaliação da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato esterilizado

Plantas de tomateiro com o quarto par de folhas completamente desenvolvidos foram inoculadas com o patógeno *Fol* $1,3 \times 10^7$ microconídios mL⁻¹. A suspensão de microconídios foi calibrada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz, utilizando objetiva de 20×. As plantas foram retiradas dos vasos, o sistema radicular foi cuidadosamente lavado em água de torneira corrente e seccionado 1 cm a partir do ápice. Em seguida, as raízes foram submersas por 3 min na suspensão de conídios do patógeno e novamente plantadas (REIS *et al.*, 2005). A severidade da doença foi avaliada quando surgiram os sintomas típicos da doença,

utilizando uma escala de notas proposta por De Cal *et al.* (1995), em que 1 = plantas sem sintomas, 2 = folhas baixeiras amarelas, 3 = folhas baixeiras mortas e algumas folhas superiores amarelas, 4 = folhas baixeiras mortas e algumas superiores murchas e 5 = planta morta. A partir das notas, foi calculado o índice de doença (ID) através da fórmula proposta por McKinney (1923):

$$(ID\%) = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{5 \times n} \times 100$$

em que A, B, C, D e E = número de plantas com as notas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente; e n = número total de plantas ($n = A + B + C + D + E$) multiplicado pelo número máximo da escala de notas.

2.6. Seleção massal

Foram selecionados os antagonistas capazes de reduzir 60% ou mais a mancha-bacteriana e em 50% ou mais a murcha-de-fusário em plantas de tomateiro, cultivadas em substrato esterilizado. Cada antagonista selecionado foi novamente desafiado contra os patógenos *Xg* e *Fol*, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado. Testou-se também a eficiência dos antagonistas selecionados para o biocontrole da pinta-preta do tomateiro, causada por *As*, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado.

2.7. Inoculação com *X. gardneri* e avaliação da severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado

O experimento foi elaborado à semelhança do experimento anterior, em que as plantas foram inoculadas com *Xg*, em que as mesmas foram cultivadas em substrato esterilizado. Entretanto, os antagonistas foram aplicados nas plantas por microbiolização de sementes e encharcamento de solo. Foram adicionados 50 mL⁻¹ da suspensão de cada um dos isolado no solo, cinco dias antes da inoculação com *Xg*. A densidade ótica (DO₅₄₀) foi ajustada para 0,5 (aproximadamente 5×10^{10} UFC mL⁻¹), adicionando solução salina (0,85%) ao crescimento bacteriano. Plantas pulverizadas com oxiclreto de cobre foram utilizadas como controle negativo da mancha-

bacteriana. Para a quantificação da mancha-bacteriana, as folhas de tomateiro foram escaneadas, depois processadas com o *software* Adobe Photoshop Elements 9[®] e a severidade da doença estimada com o *software* QUANT[®] (LIBERATO, 2003).

2.8. Inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e avaliação da severidade da murcha-de-fusário do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado

O experimento foi elaborado à semelhança do experimento anterior, em que as plantas foram inoculadas com *Fol*, em que as mesmas foram cultivadas em substrato esterilizado. Entretanto, todos os antagonistas foram testados em um único ciclo. Os antagonistas foram aplicados nas plantas por microbiolização de sementes e encharcamento de solo, cinco dias antes da inoculação com *Fol*. A densidade ótica (DO₅₄₀) foi ajustada para 0,5 (aproximadamente 5×10^{10} UFC mL⁻¹), adicionando solução salina (0,85%) ao crescimento bacteriano. A unidade experimental foi constituída de seis plantas por vaso, com capacidade de 5 dm³ de solo.

2.9. Inoculação com *A. solani* e avaliação da severidade da pinta-preta do tomateiro, em plantas cultivadas em substrato não esterilizado

O experimento foi elaborado à semelhança dos experimentos anteriores no processo de seleção massal dos antagonistas contra *Xg* e *Fol*, em que as plantas foram cultivadas em substrato esterilizado. Para a esporulação de *As*, o fungo foi cultivado em meio V8 (200 mL de V8[®], 20 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada), a 25 °C, no escuro, sob agitação durante sete dias. Após esse período, a massa de micélio foi triturada em liquidificador e a suspensão depositada em meio BDA (pH 6,5) em placas de Petri, as quais permaneceram em câmaras de crescimento tipo B.O.D., a 25 °C, sob luz negra, com 12 horas de fotoperíodo (RODRIGUES *et al.*, 2010). Plantas de tomateiro com o quinto par de folhas completamente desenvolvido foram pulverizadas com a suspensão de conídios de *A. solani* na concentração de $5,0 \times 10^3$ conídios mL⁻¹ com auxílio de um atomizador De Vilbs n^o 15. Após inoculação, as plantas ficaram por 24 horas em câmara úmida, a 26 °C. Quando surgiram os sintomas da pinta-preta a doença foi avaliada utilizando-se a escala diagramática proposta por Boff *et al.* (1991). Os dados da escala diagramática foram utilizados

para calcular a área abaixo da curva do progresso da pinta-preta (AACPPP), de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1997). Todas as folhas de cada planta foram utilizadas para quantificar a severidade da pinta-preta, obtendo-se a média da severidade das folhas para as duas plantas da repetição de cada tratamento.

2.10. Bioensaio de colonização de raízes

Foi verificado o potencial dos antagonistas selecionados no processo de seleção massal em colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro; os bioensaios foram realizados segundo Silva *et al.* (2003), com algumas modificações.

Culturas de rizobactérias e actinomicetos com 24 e 48 horas de idade, respectivamente foram usadas para microbiolizar as sementes de tomateiro (cultivar Santa Clara). A densidade ótica (DO_{540}) foi ajustada para 0,5 (aproximadamente 5×10^{10} UFC mL⁻¹), adicionando solução salina (0,85%) ao crescimento bacteriano. As sementes foram desinfestadas com álcool 70%, por 30 s, e hipoclorito de sódio 2%, por 3 min; em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada. As sementes foram microbiolizadas com as suspensões de cada um dos isolados por 12 horas. Decorrido este intervalo de tempo, as sementes foram transferidas para tubos contendo Phytigel (2,5 g L⁻¹) (Sigma-Aldrich, São Paulo), previamente esterilizados. Inspeções diárias foram realizadas para detecção de crescimento bacteriano em torno das raízes. Cada tratamento foi repetido três vezes e cada tubo continha duas sementes. Sementes não microbiolizadas serviram como controle.

2.11. Análise estatística dos dados

Os experimentos para avaliar a severidade das doenças foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott- Knott ($P \leq 0,05$). Para análises estatísticas utilizou-se o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. Resultados

3.1. Isolamento das rizobactérias totais, bactérias endosporogênicas e actinomicetos

Um total de 635 isolados de procariotas foi utilizado, dos quais 590 foram isolados no presente trabalho (Tabela 1) e 45 obtidos de seleções anteriores, realizadas no Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (Tabela 2). Dos 590 isolados, 196 foram obtidos pelo método de isolamento de rizobactérias totais, 229 pelo método de isolamento de rizobactérias endosporogênicas e 165 pelo método de isolamento de actinomicetos. Dos isolados obtidos da rizosfera de tomateiro, 376 e 82 isolados foram provenientes de cultivo convencional e orgânico, respectivamente. Da floresta de eucalipto foram obtidos 57 isolados e de floresta nativa foram obtidos 75 isolados.

Tabela 1 – Isolados bacterianos obtidos de solo de rizosfera de diferentes plantas, em diferentes condições de cultivo, para seleção de antagonistas a serem utilizados no biocontrole da murcha-de-fusário e da mancha-bacteriana do tomateiro

Nº da Amostra	Origem	Natureza	Nº do Isolado
1	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	1 a 12
		RE ¹	115 a 118
		RE ²	168 a 186
		AC	273 a 292
2	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	13 a 40
		RE ¹	119 a 128
		RE ²	187 a 200
		AC	293 a 302
3	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	41 a 50
		RE ¹	201 a 209
		RE ²	210 a 214
		AC	303 a 312
4	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	238 a 253
		RE ¹	129 a 142
		RE ²	83 a 100
		AC	313 a 320

Continua...

Tabela 1, cont.

Nº da Amostra	Origem	Natureza	Nº do Isolado
5	Tomate convencional, Horta-velha UFV, Viçosa, MG	RT	67 a 82
		RE ¹	233 a 237
		RE ²	51 a 66
6	Tomate convencional, Horta-velha UFV, Viçosa, MG	AC	321 a 372
		RT	215 a 232
		RE ¹	143 a 156
7	Tomate orgânico, Sítio Criciúma, Viçosa, MG	RE ²	254 a 272
		AC	385 a 392
		RT	101 a 114
8	Tomate orgânico, Sítio Criciúma, Viçosa, MG	RE ¹	157 a 164
		RE ²	165 a 167
		AC	393 a 406
9	Tomate convencional, Amajari, Roraima	RT	486 a 495
		RE ¹	420 a 422
		RE	415 a 419
10	Floresta de Eucalipto Pátio Pacanari, Jari celulose SA, PA	AC	568 a 570
		RT	496 a 507
		RE ¹	423 a 427
11	Floresta de Eucalipto Área 01, Jari celulose SA, PA	RE	428 a 432
		AC	407 a 410
		RT	508 a 524
12	Floresta Nativa, Área 20, Jari celulose SA, PA	RE ¹	433 a 436
		RE ²	437 a 442
		AC	411 a 414
13	Floresta Nativa, Divisa das áreas 11 e 26, Jari celulose SA, PA	RT	525 a 545
		RE ¹	443 a 445
		RE ²	446 a 448
14	Tomate orgânico Brumadinho, MG	AC	373 a 384
		RT	546 a 560
		RE ¹	449 a 451
15	Tomate orgânico Brumadinho, MG	RE ²	452 a 464
		AC	571 a 575
		RT	561 a 567
16	Tomate orgânico Brumadinho, MG	RE ¹	465 a 471
		RE ²	472 a 485
		AC	576 a 590

¹ Isolamento em meio extrato de solo-ágar; e ² Isolamento em meio 523. Total de bactérias obtidas: RT = rizobactérias totais = 196; RE = rizobactérias endosporogênicas = 239; e AC = actinomicetos = 165.

Tabela 2 – Isolados bacterianos pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa

Isolados	Identificação	Natureza	Referência	Código de Tese
591	NI ¹	Bactéria	Silva (2002)	B026R
592*	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	Silva (2002)	UFV101
593	<i>Pseudomonas putida</i>	Bactéria	Halfeld-Vieira (2002a)	UFV0073
594	NI	Bactéria	Silva (2002)	B423R
595	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	Silva (2002)	B212R
596	NI	Bactéria	Silva (2002)	B256R
597	NI	Bactéria	Silva (2002)	B205R
598	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	Halfeld-Vieira (2002a)	IEA6
599*	NI	Bactéria	Silva (2002)	B101R
600	NI	Bactéria	Silva (2002)	B224R
601	NI	Bactéria	Silva (2002)	B023R
602	NI	Bactéria	Silva (2002)	B302
603	NI	Bactéria	Silva (2002)	UFV005
604	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	Vieira Júnior (2005)	UFV172
605	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	Vieira Júnior (2005)	UFV75
606	<i>Pseudomonas putida</i> biotipo B	Bactéria	Mendonça (2006)	RP053
607	NI	Bactéria	Silva (2002)	B322R
608	NI	Bactéria	Silva (2002)	B235R
609	<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	Vieira Júnior (2005)	UFV075
610	NI	Bactéria	Silva (2002)	B403R
611	NI	Bactéria	Silva (2002)	B182R
612	NI	Bactéria	Silva (2002)	B412R
613	NI	Bactéria	Silva (2002)	B316R
614	NI	Actinomiceto	Silva (2002)	A479R
615	<i>Streptomyces setonii</i>	Actinomiceto	Macagnan (2005)	Ac79
616	<i>Streptomyces setonii</i>	Actinomiceto	Macagnan (2005)	Ac19
617	<i>Streptomyces setonii</i>	Actinomiceto	Carrer Filho (2001)	RD1
618	<i>Streptomyces setonii</i>	Actinomiceto	Macagnan (2005)	Ac26
619		Actinomiceto	Silva (2002)	A092R
620	<i>Streptomyces setonii</i>	Actinomiceto	Macagnan (2005)	Ac04
621	<i>Streptomyces setonii</i>	Actinomiceto	Macagnan (2005)	Ac68
622	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF76B
623	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF04
624	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF22
625	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF114

Continua...

Tabela 2, cont.

Isolados	Identificação	Natureza	Referência	Código de Tese
626	NI	Actinomiceto	Silva (2002)	A058R
627	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF113C
628	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF112
629	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF182
630	NI	Actinomiceto	Silva (2002)	A097R
631	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF76
632	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF110
633	NI	Actinomiceto	Silva (2002)	A067R
634	<i>Nocardioides thermolilacinus</i>	Actinomiceto	Carrer Filho (2001)	SON17
635	NI	Actinomiceto	Moura (1996)	BF17

* 599 e UFV592 são o mesmo isolado de *Bacillus cereus*.

NI¹ = não identificado.

3.2. Seleção massal

Foram selecionados 29 isolados bacterianos (Tabela 3), capazes de reduzir a mancha-bacteriana e a murcha-de-fusário em tomateiro em pelo menos 60 e 50%, respectivamente. Dos isolados selecionados, 25 foram obtidos no presente trabalho e quatro oriundos da coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. Do cultivo de tomateiro convencional e orgânico foram selecionados 17 e dois isolados, respectivamente. Da floresta de eucalipto foram selecionados seis isolados e de mata nativa não foi selecionado nenhum isolado. Dos isolados selecionados no presente trabalho, 13 foram obtidos por meio da metodologia de isolamento de rizobactérias totais, oito foram obtidos pela metodologia de isolamento de bactérias endosporogênicas e quatro foram obtidos pela metodologia de isolamento actinomicetos.

Tabela 3 – Isolados de rizobactérias que reduziram a mancha-bacteriana e a murcha-de-fusário em plantas de tomateiro, em 60% ou mais e 50% ou mais, respectivamente, em relação à testemunha (plantas não tratadas com os isolados bacterianos)

Isolado	Origem do Isolado	Natureza	% de Redução da Murcha-de-Fusarium	% de Redução da Mancha-Bacteriana
UFV12	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	60,01	80,57
UFV13	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	60,01	71,80
UFV19	Tomate convencional, Coimbra, MG	RT	60,01	75
UFV90	Tomate convencional, Horta-velha UFV, Viçosa, MG	RT	60,01	84,62
UFV100	Tomate convencional, Horta-velha UFV, Viçosa, MG	RT	80	71,80
UFV103	Tomate orgânico, Sítio Criciúma, Viçosa, MG	RT	80	91,03
UFV113	Tomate orgânico, Sítio Criciúma, Viçosa, MG	RT	60,01	88,47
UFV128	Tomate convencional, Coimbra, MG	RE	60,01	82,06
UFV187	Tomate convencional, Coimbra, MG	RE	60,01	82,06
UFV205	Tomate convencional, Coimbra, MG	RE	71,43	73,02
UFV214	Tomate convencional, Coimbra, MG	RE	71,43	71,43
UFV216	Tomate convencional, Coimbra, MG	RE	60,01	79,37
UFV221	Tomate convencional, Coimbra, MG	RE	60,01	82,54
UFV252	Tomate convencional, Horta-velha UFV, Viçosa, MG	RE	71,43	79,37
UFV302	Tomate convencional, Coimbra, MG	AC	54,55	70,22
UFV365	Tomate convencional, Horta-velha UFV, Viçosa, MG	AC	89,82	65,96
UFV411	Tomate convencional, Coimbra, MG	AC	63,64	61
UFV418	Tomate convencional, Amajari, Roraima	AC	71,43	76,67
UFV428	Floreta de eucalipto Pátio Pacanari, Jari celulose SA, PA	RE	71,43	90,48
UFV487	Tomate convencional, Amajari, Roraima	RT	70	67,22
UFV500	Floreta de eucalipto Pátio Pacanari, Jari celulose SA, PA	RT	60,01	70,5

Continua...

Tabela 3, cont.

Isolado	Origem do Isolado	Natureza	% de Redução da Murcha-de-Fusarium	% de Redução da Mancha-Bacteriana
UFV502	Floresta de eucalipto Pátio Pacanari, Jari celulose SA, PA	RT	60,01	70,5
UFV508	Floresta de eucalipto , Área 01, Jari celulose SA, PA	RT	60,01	70,5
UFV516	Floresta de eucalipto , Área 01, Jari celulose SA, PA	RT	60,01	63,94
UFV518	Floresta de eucalipto , Área 01, Jari celulose SA, PA	RT	60,01	93,73
UFV592*	Silva (2002)	<i>Bacillus cereus</i> (UFV-101)	80	70
UFV599*	Silva (2002)	<i>Bacillus cereus</i> (B101R)	60,01	70
UFV618	Macagnan (2005)	<i>Streptomyces setonii</i> (Ac26)	80	70
UFV633	Silva (2002)	AC (A067R)	60,01	84,01

RT = rizobactéria total; RE = rizobactéria endosporogênica; e AC = actinomiceto. *UFV592 e UFV599 são o mesmo isolado de *Bacillus cereus*.

3.3. Bioensaio dos antagonistas selecionados em promover o controle da mancha-bacteriana, murcha-de-fusário e da pinta-preta em plantas de tomateiro cultivadas em substrato não esterilizado

Dos 29 isolados, 22 foram capazes de reduzir a severidade da mancha-bacteriana do tomateiro e 11 reduziram a doença em patamar semelhante ao proporcionado pelo fungicida oxiclreto de cobre (Figura 1). Os isolados 103, 90, 205, 365 e 592 reduziram a severidade em 95, 91, 88, 87 e 80%, respectivamente.

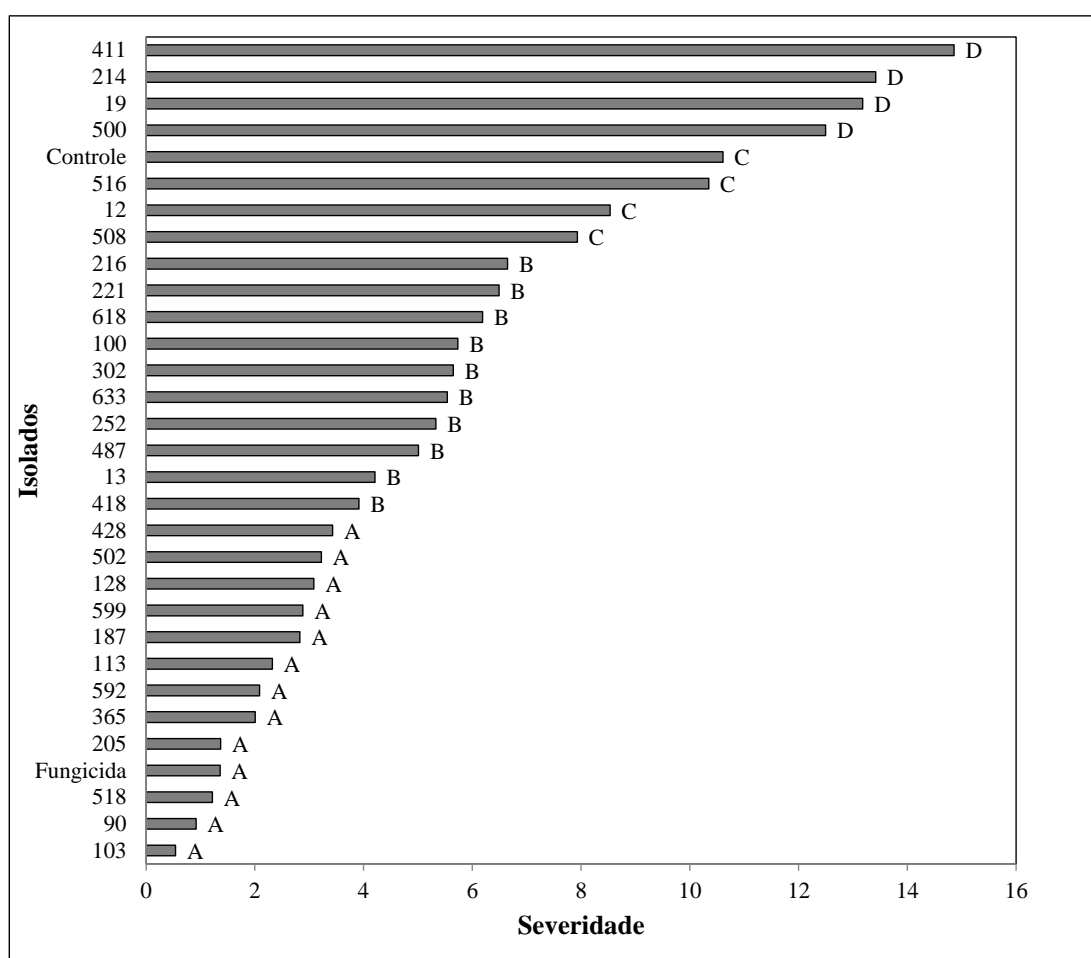


Figura 1 – Biocontrole experimental da mancha-bacteriana do tomateiro por rizobactérias. O controle positivo foi composto por plantas não tratadas com os antagonistas e no controle negativo as plantas foram pulverizadas com oxiclreto de cobre. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

Dos isolados selecionados, 13 foram eficientes em reduzir o índice de doença (ID) da murcha-de-fusário (Figura 2). Os isolados 592, 618, 12, 620 e 252 reduziram o ID em 43, 43, 38, 36 e 35%, respectivamente.

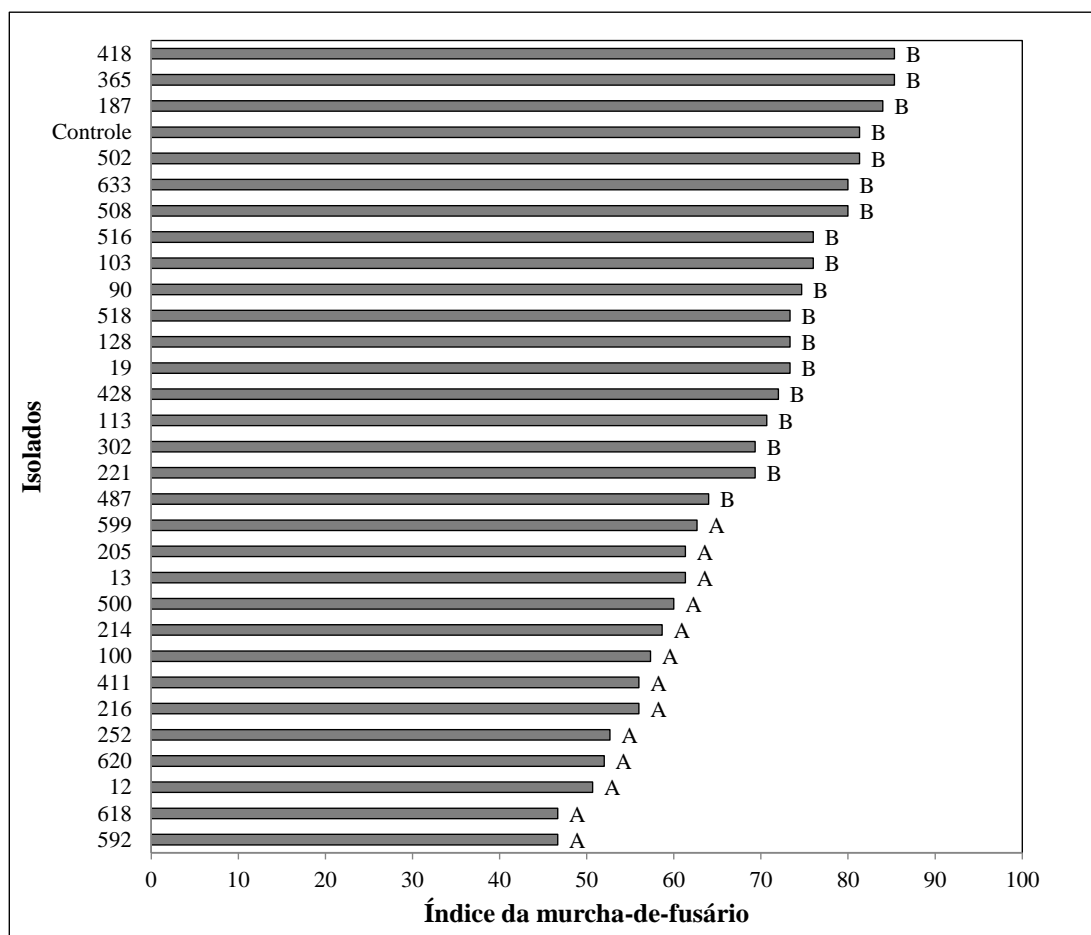


Figura 2 – Biocontrole experimental da murcha-de-fusário por isolados de rizobactérias. O controle foi composto por plantas não tratadas com os antagonistas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

No biocontrole experimental da pinta-preta do tomateiro, 15 dos 29 isolados reduziram a AACPPP (Figura 3). Quatro antagonistas reduziram a AACPPP da doença a um nível igual ao das plantas que foram pulverizadas com o fungicida clorotalonil. Os isolados 302, 252, 618 e 214 reduziram a AACPPP em 60,5, 59, 54,5 e 52,5, respectivamente.

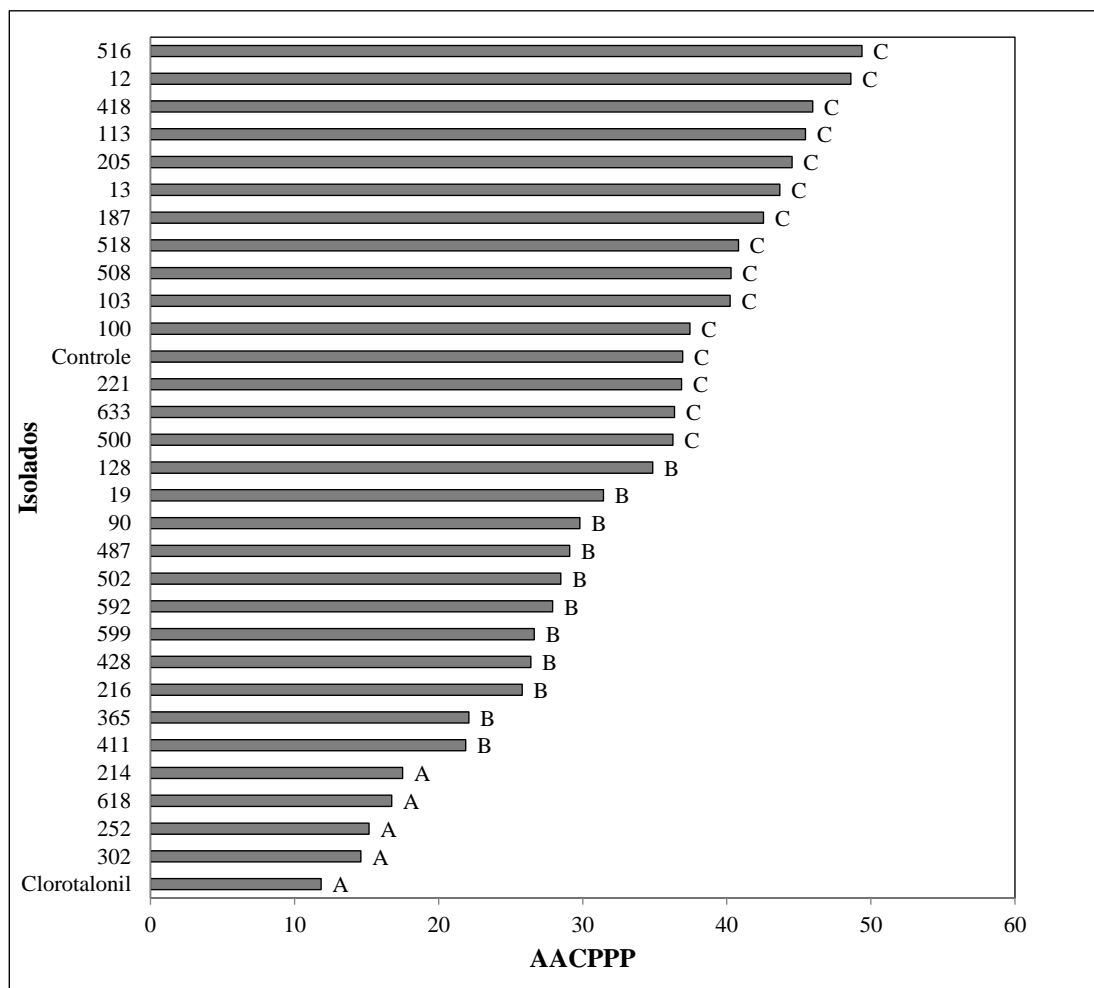


Figura 3 – Área abaixo da curva do progresso da pinta-preta (AACPP) em planta de tomateiro tratadas com rizobactérias e com chlorotalonil. O controle foi composto por plantas não tratadas com os antagonistas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

Os isolados 252, 618, 592, 599 e 302 proporcionaram maior redução média da severidade da mancha-bacteriana, murcha-de-fusário e da pinta-preta (Tabela 4).

3.4. Bioensaio de colonização de raízes

Todos os 29 isolados selecionados (Tabela 3) foram capazes de colonizar o sistema radicular.

Tabela 4 – Ordem decrescente dos antagonistas que mais reduziram a murcha-de-fusário, mancha-bacteriana e pinta-preta do tomateiro, em percentagem média, em relação à testemunha (plantas não tratadas com os isolados bacterianos)

Isolados	Natureza	% de Redução da Murcha-de-Fusarium	% de Redução da Mancha-Bacteriana	% de Redução da Pinta-Preta	% da Redução Média das Doenças
UFV252	RE	35,03	49,77	58,96	47,92
UFV618	AC	42,62	41,69	54,67	46,33
UFV592*	RE	21,31	80,35	24,42	42,03
UFV599*	RE	22,95	72,82	27,90	41,22
UFV302	AC	14,75	46,76	60,46	40,66
UFV365	AC	0	81,10	40,19	40,43
UFV90	RT	8,2	91,33	19,32	39,62
UFV205	RE	24,59	87,09	0	37,23
UFV428	RE	11,48	67,67	28,54	35,90
UFV103	RT	6,56	94,89	0	33,82
UFV216	RE	31,15	37,37	30,17	32,90
UFV487	RT	21,31	52,80	21,23	31,78
UFV502	RT	0	69,64	22,89	30,84
UFV113	RT	13,11	78,11	0	30,41
UFV128	RE	9,84	70,93	5,62	28,80
UFV13	RT	24,59	60,34	0	28,31
UFV214	RE	27,87	0	52,62	26,83
UFV100	RT	29,51	45,96	0	25,16
UFV187	RE	0	73,34	0	24,45
UFV411	AC	31,15	0	40,76	23,97
UFV418	AC	0	63,11	0	21,04
UFV12	RT	37,70	19,58	0	19,09
UFV221	RE	14,75	38,85	0,20	17,93
UFV633	AC	1,64	47,81	1,53	16,99
UFV500	RT	26,23	0	1,84	9,36
UFV508	RT	1,64	25,26	0	8,97
UFV19	RT	9,84	0	14,88	8,24
UFV516	RT	6,56	2,49	0	3,02

* Os isolados UFV592 e UFV599 são o mesmo isolado de *Bacillus cereus* (UFV-101); RT = Rizobactéria total, RE = Rizobactéria endosporogênica; e AC = Actinomiceto.

4. Discussão

Somente cerca de 0,1 a 1% das bactérias são cultiváveis em condições de laboratório e mesmo para as cultiváveis só as mais abundantes são isoladas, permitindo a obtenção de cultura pura (MADIGAN *et al.*, 2000). Possivelmente, muitas bactérias que seriam eficientes no controle de doenças em plantas não são cultiváveis em condições de laboratório. Buscando amostrar uma maior diversidade, foram isoladas bactérias da rizosfera de plantas-escape ou apresentando baixa severidade de doenças em cultivo de tomateiro convencional e orgânico, de floresta de eucalipto e de floresta nativa, utilizando metodologias para o isolamento de actinomicetos e de rizobactérias totais e endosporogênicas. Solos supressivos a vários patógenos de solo têm sido associados à presença de espécies de *Pseudomonas* spp. (MAZZOLA, 2002; SIDDIQUI *et al.*, 2005; RAMETTE *et al.*, 2006). Entretanto, produtos comercializados à base de *Pseudomonas* spp. fluorescentes têm, geralmente, falhado no biocontrole, em virtude da curta viabilidade por longo período de tempo, já que essas bactérias não produzem estruturas de resistência (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). Procurando amostrar grande número de isolados bacterianos capazes de produzir esporos de resistência, foram utilizadas técnicas específicas para a obtenção de rizobactérias endosporogênicas e actinomicetos. Algumas espécies de bactérias gram positivas pela habilidade de produzirem esporos resistentes ao calor e à dessecação podem ser prontamente formuladas em produtos estáveis (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). Bactérias endosporogênicas e actinomicetos sobrevivem por longo período de tempo, em comparação com as bactérias não endosporogênicas, uma vez que endósporos são tidos como a estrutura biológica de maior resistência aos fatores químicos e físicos (MADIGAN *et al.*, 2000; HAMDALI *et al.*, 2008). Adicionalmente, algumas bactérias endosporogênicas e actinomicetos podem produzir substâncias antimicrobianas (DEMAIN; LANCINI, 2001; HAMDALI *et al.*, 2008), assim como podem induzir resistência em plantas (HALFELD-VIEIRA, 2002b; SILVA *et al.*, 2004; HAMDALI *et al.*, 2008).

Dos 635 isolados, 29, ou seja 4,56% foram capazes de reduzir as doenças do tomateiro causadas por *Fol* e *Xg* em 50% ou mais e em 60% ou mais, respectivamente. Comparado a outros processos de seleção de candidatos, a antagonista para o controle de doenças em plantas, o isolamento de bactérias da rizosfera de plantas-escape ou apresentando baixa severidade de doenças em cultivo de tomateiro com-

vencional e orgânico, de floresta de eucalipto e de floresta nativa, utilizando metodologias para o isolamento de actinomicetos e de rizobactérias totais e endósporigênicas, apresentou bom percentual de microrganismos selecionados. Segundo Chen *et al.* (1996), o número de rizobactérias eficientes no controle biológico não ultrapassa 0,6% do total da população. Foram isoladas 500 bactérias da rizosfera de plantas de tomate sadias, selecionou-se 28, ou seja, 5,6% capazes de reduzir a pinta-bacteriana do tomateiro (SILVA; ROMEIRO, 2004). No trabalho de Silva e Romeiro (2004), a percentagem de rizobactérias selecionadas foi semelhante com a percentagem do processo de seleção do presente trabalho. No entanto, no presente trabalho foram selecionadas rizobactérias capazes de reduzir a severidade de duas doenças e no trabalho de Silva e Romeiro (2004) apenas de uma.

Na rizosfera de plantas de tomateiro convencional e orgânico foram selecionados 4,52 e 2,44% dos isolados obtidos, respectivamente. Na rizosfera de floresta nativa não foi selecionada nenhuma rizobactéria e na floresta de eucalipto foram selecionados 10,52% dos isolados. Era esperado maior percentual dos isolados selecionados nas plantas de tomateiro, no entanto, a maioria dos isolados selecionados foi obtida da rizosfera de plantas de eucalipto. Talvez isto seja explicado porque bactérias são organismos muito versáteis fisiologicamente (MADIGAN *et al.*, 2000). Dessa forma, bactérias isoladas na rizosfera de uma cultura poderiam ser capazes de promover o controle de doença em outra cultura, traçando um paralelo com as bactérias fitopatogênicas que, na ausência do hospedeiro principal, são capazes de parasitar hospedeiros alternativos ou de sobreviver em seu filoplano (ROMEIRO, 2005), bactérias antagonistas poderiam sobreviver em outras plantas. Há muitos exemplos na literatura de microrganismos isolados em uma cultura promovendo o biocontrole em outra cultura. Um isolado de *Pseudomonas putida* e um isolado de *Bacillus cereus* obtidos de tomateiro foram eficientes na redução da severidade do crestamento bacteriano comum do feijoeiro quando pulverizados no filoplano (GARCIA, 2008). O isolado *B. atrophaeus* S2BC-2 foi isolado de rizosfera de plantas de jardim e aplicado por microbiolização de sementes e encharcamento de solo em plantas de tomateiro, as plantas tratadas com S2BC-2 tiveram redução na severidade de 57 e 50% nas plantas inoculadas com *Fol* e *As*, respectivamente (SHANMUGAM *et al.*, 2011). Parece que isolados provenientes de uma cultura podem exercer o controle de doenças em outra cultura. No presente trabalho foi mostrado que bactérias provenientes da rizosfera de plantas tanto de tomateiro

quanto de eucalipto foram eficientes no controle biológico da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário.

No bioensaio dos antagonistas selecionados em plantas de tomateiro cultivadas em substrato não esterilizado, foi observado que alguns isolados não foram capazes de reduzir a severidade da mancha bacteriana e o ID da murcha-de-fusário em solos não esterilizados. Possivelmente, por não serem capazes de competir com a microbiota autóctone do solo, não sendo capazes de manter a sua população em um nível adequado para exercer o biocontrole. Resultados semelhantes foram obtidos por Yuan e Crawford (1995) para o isolado de *Streptomyces lydicus* WYEC108, que foi selecionado por sua eficiência em controlar vários patógenos de solo. A população do isolado WYEC108 quando adicionada a solo não esterilizado foi 100 vezes menor do que a população do agente de biocontrole adicionada a solo esterilizado. Os autores postularam que a competição com a microbiota indígena no solo não esterilizado foi provavelmente responsável por esse decréscimo na população do isolado WYEC108. Quinze dos 29 isolados selecionados para o biocontrole da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário foram eficientes em reduzir a AACPPP em solo esterilizado.

A capacidade de colonização do sistema radicular é uma condição *sine qua non* para que um isolado bacteriano seja considerado uma PGPR (van LOON *et al.*, 1998). Todos os 29 isolados selecionados foram capazes de colonizar o sistema radicular e de reduzir a severidade da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário em plantas de tomate em solo esterilizado. Possivelmente, o biocontrole foi conseguido porque na ausência da microbiota autóctone do solo, os isolados conseguiram estabelecer na rizosfera das plantas de tomate em um nível populacional adequado para que suas atividades antagonísticas fossem exercidas; já em condições de solo não esterilizado alguns dos isolados não foram efetivos no biocontrole.

Os resultados permitem concluir que: i) o isolamento de bactérias da rizosfera de plantas-escape ou apresentando baixa severidade de doenças em cultivo de tomateiro convencional e orgânico, de floresta de eucalipto e de mata nativa, utilizando metodologias para o isolamento de actinomicetos e de rizobactérias totais e endosporogênicas, foi eficiente para obtenção de antagonistas para o controle da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário; ii) nas plantas cultivadas em substrato esterilizado foram selecionadas 29 rizobactérias capazes de controlar tanto a mancha-bacteriana quanto a murcha-de-fusário; iii) alguns dos 29 isolados bacterianos

selecionados não foram capazes de exercer o biocontrole em solo não esterilizado e 15 isolados foram eficientes no controle da pinta-preta; e iv) todas as rizobactérias selecionadas foram capazes de colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro.

É necessário determinar os mecanismos responsáveis pela eficiência dos agentes de biocontrole contra os patógenos fúngicos e bacteriano, uma vez que podem estar envolvidos a antibiose, o parasitismo, a competição por nutrientes ou até a indução de resistência, já que a inespecificidade de controle de doenças causadas por diversos organismos é uma das características deste mecanismo de ação.

5. Referências bibliográficas

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Plataforma de pesquisa de agrotóxicos registrados para o Brasil*. 2012. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 6 jun. 2012

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA*. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias>>. Acesso em: 7 dez. 2012.

BOFF, P.; ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X. Escalas para avaliação de severidade da mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta-preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 16, p. 280-283, 1991.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279 p.

CARRER FILHO, R. *Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro*. 2001. 78 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; Gupta, V. K. (Ed.). *Management of soil borne diseases*. New Delhi: Kalyani Publishers, 1996. p. 165-184.

DE CAL, A.; PASCUAL, S.; LARENA, I.; MELGAREJO, P. Biological control of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. *Plant Pathology*, v. 44, p. 909-917, 1995.

DEMAIN, A. L.; LANCINI, G. Bacterial pharmaceutical products. In: Dworkin, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed). *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. New York: Springer-Verlag, 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. *Basic plant pathology methods*. ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. 355 p.

FAOSTAT. FAO *Statistics division: food and agriculture organization of the united nations*. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

FARAJZADEH, D.; YAKHCHALI, B.; ALIASGHARZAD, N.; SOKHANDAN-BASHIR, N.; FARAJZADEH, M. Plant Growth promoting characterization of indigenous azotobacteria isolated from soils in Iran. *Current Microbiology*, v. 64, p. 397-403, 2012.

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

FINLEY, N.; FIELDS, M. L. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal Applied Microbiology*, v. 10, p. 231-236, 1962.

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 Applied Microbiology*, v. 89, p. 840-846, 2000.

GARCIA, F. A. O. *Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento em feijoeiro*. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

HALFELD-VIEIRA, B. A. *Bactérias residentes de filoplano do tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura*. 2002a. 98 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002a.

HALFELD-VIEIRA, B. A. Procariotas residentes de filoplano como indutores de resistência à doenças em tomateiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., São Pedro: ed. SF Pascholati, 2002b. p. 18-19.

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

HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M.; OUHDOUCH, Y. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 2565-2575, 2008.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. *Compendium of tomato diseases*. St. Paul: APS Press, 1991. 73 p.

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

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

KUMAR, G. P.; KISHORE, N.; AMALRAJ, E. L. D.; AHMED SKMH, RASUL, A.; DESAI, S. Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regulation*, v. 67, p. 133-140, 2012.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Ceres, 1997. p. 690-719.

LIBERATO, J. R. *Desenvolvimento e avaliação do programa Quant para a quantificação de doenças de plantas por análise de imagens digitais*. 2003. 100 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

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

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, v. 85, p. 528-536, 1995.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 541-556, 2009.

MACAGNAN, D. *Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso**. 2005. 113 f Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock: biology of Microorganisms*. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 991 p.

MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 81, p. 557-564, 2002.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v. 26, p. 195-217, 1923.

MELLO, S. C. M.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 447-448, 1997.

MENDONÇA, H. L. *Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento e indutoras de resistência sistêmica em feijoeiro*. 206, 63 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 540-544, 1995.

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

MUNOZ, Z.; MORET, A.; GARCES, S. The use of *Verticillium dahliae* and *Diplodia scrobiculata* to induce resistance in *Pinus halepensis* against *Diplodia pinea* infection. *European Journal of Plant Pathology*, v. 120, p. 331-337, 2008.

MYRESIOTIS, C. K.; KARAOGLANIDIS, G. S.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium crown and root rot* on tomato. *Pest Management Science*, v. 68, p. 404-411, 2012.

PATIL, H. J.; SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D. P.; CHAUDHARI, B. L.; ARORA, D. K. Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop Protection*, v. 30, p. 1269-1273, 2011.

PRAMER, D.; SCHMIDT, E. L. *Experimental soil microbiology*. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1964. 107p.

RAMETTE, A.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DEFAGO, G. Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *Fems Microbiology Ecology*, v. 55, p. 369-381, 2006.

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 426-428, 2005.

RODRIGUES, T. T. M. S.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E. S. G. In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*, v. 35, p. 203-212, 2010.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias fitopatogênicas*. Viçosa: Editora UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. S. *Controle biológico de doenças em plantas: procedimentos*. Viçosa: Editora UFV, 2007a. 172p.

ROMEIRO, R. S. *Controle biológico de plantas: fundamentos*. Viçosa: Editora UFV, 2007b. 269 p.

SHANMUGAM, V.; ATRI, K.; GUPTA, S.; KANOUIA, N.; NARUKA, D. S. Selection and differentiation of *Bacillus* spp. Antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* and *Alternaria solani* infecting Tomato. *Folia Microbiologica*, v. 56, p. 170-177, 2011.

SHANMUGAM, V.; KANOUIA, N. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control*, v. 57, p. 85-93, 2011.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, Z. A.; AHMAD, I. Evaluation of fluorescent *Pseudomonads* and *Bacillus* isolates for the biocontrol of a wilt disease complex of pigeonpea. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, p. 729-732, 2005.

SILVA, H. S. A. *Rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro (lycopersicon esculentum mill.) e indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares da cultura*. 2002. 115 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. D. S.; MOUNTEER, A. Development of a Root Colonization Bioassay for Rapid Screening of Rhizobacteria for Potential Biocontrol Agents. *Journal of Phytopathology*, v. 151, p. 42-46, 2003.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S. Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. *Revista Ceres*, v. 51, p. 345-354, 2004.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, v. 29, p. 288-295, 2004.

THANH, D. T.; TARN, L. T. T.; HANH, N. T.; TUYEN, N. H.; BHARATHKUMAR, S.; LEE, S. V.; PARK, K. S. Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in Vietnam. *Plant Pathology Journal*, v. 25, p. 263-269, 2009.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M.; CORREIA, L. G. Avaliação fitossanitária da cultura do tomateiro em regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, p. 211, 1992.

van LOON, L. C.; BAKKER PAHM, PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of phytopathology*, v. 36, p. 453-483, 1998.

VIEIRA JÚNIOR, J. R. *Procariontes residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura*. 2005. 146 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

WILLIAMS, S. T.; DAVIES, F. L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *Journal Genetic Microbiology*, v. 38, p. 251-262, 1965.

YUAN, W. M.; CRAWFORD, D. L. Characterization of streptomyces-lydicus wyec108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 3119-3128, 1995.

ZAMBOLIM, L. *Manejo integrado-fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto*. Viçosa: Editora UFV, 2001. 722 p.

ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X. F.; JING, W.; YANG, J. L.; SU, Z. P. Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani*, *Rhizopus stolonifer*, and *Botrytis cinerea* on tomato fruit by *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83: 132-136, 2008.

Rizobactérias e ácido jasmônico na redução dos sintomas de doenças do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa

Resumo: Avaliou-se a capacidade dos antagonistas UFV618 (*Streptomyces setonii*), UFV592 (*Bacillus cereus*) e UFV252 (não identificado) e o indutor ácido jasmônico (AJ) no controle da mancha-bacteriana, murcha-de-fusário e pinta-preta e na atividade de enzimas de defesa: β -1,3-glucanases (GLU), quitinases (QUI), peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), lipoxigenases (LOX) e fenilalanina amônia-liases (FAL), além da concentração de aldeído malônico (MDA). Para cada um dos patógenos desafiadores *Xanthomonas gardneri* (*Xg*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) e *Alternaria solani* (*As*) foram esquematizados dois experimentos, sendo um para a quantificação da severidade e o outro para a obtenção de amostras para as análises bioquímicas. Os antagonistas foram aplicados nas plantas por microbiolização de sementes e também por encharcamento de solo, cinco dias antes da inoculação dos patógenos desafiadores e o AJ foi pulverizado nas plantas 48 horas antes da inoculação. Os tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e o AJ reduziram significativamente a AACPMB, AACPID e AACPP, exceto para as plantas inoculadas com *As*; para o tratamento UFV618 não houve redução significativa da AACPPP em comparação ao controle. Os resultados permitem concluir que para as plantas inoculadas com *Xg*, a aplicação do antagonista UFV618 resultou em maiores atividades das enzimas QUI e LOX; maiores atividades das enzimas PPO, QUI e LOX para as plantas tratadas com os antagonistas UFV592 e UFV252 e das enzimas GLU, QUI, POX, PPO e FAL para o uso do AJ. Para as plantas inoculadas com *Fol*, a aplicação dos antagonistas UFV618 e UFV592 resultaram em maiores atividades das enzimas QUI e LOX, além dessas enzimas maiores atividades da POX e FAL para as plantas pulverizadas com AJ e das enzimas PFO, FAL e QUI para as plantas onde foi aplicado o antagonista UFV252. Para as plantas inoculadas com *As*, a aplicação do antagonista UFV618 não resultou em maior atividade de nenhuma enzima de defesa; maiores atividades das enzimas QUI e FAL para as plantas tratadas com o antagonista UFV592 e das enzimas PFO e FAL para a aplicação do antagonista UFV252, além dessas enzimas maiores atividades da LOX para as plantas pulverizadas com AJ. Para as plantas inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As*, em pelo menos uma época de coleta, a concentração de MDA foi maior no controle em comparação aos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e AJ, indicando maior dano nas membranas no tratamento-controle, o que corrobora com os maiores valores de severidade observados nesse tratamento. É possível que os antagonistas estudados estejam induzindo a resistência sistêmica nas plantas de tomate, pelas seguintes evidências: i) a separação espacial entre os antagonistas e o patógeno *Xg* e *As*, o que exclui o antagonismo direto; ii) no processo de seleção dos antagonistas, estes foram eficientes contra vários patógenos; uma das características da indução de resistência é a não especificidade de proteção; e iii) no presente trabalho, os antagonistas foram capazes de aumentar a atividade de enzimas de defesa tanto em plantas inoculadas quanto para as não inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As*.

Biocontrol agents and jasmonic acid in reducing the symptoms of tomato diseases and activity of defense enzymes

Abstract: We evaluated the ability of antagonists UFV618 (*Streptomyces setonii*), UFV592 (*Bacillus cereus*), and UFV252 (unidentified) and, the inducer jasmonic acid (JA) in controlling bacterial spot, fusarium wilt, and early blight and activity of defense enzymes: β -1,3-glucanases (GLU), chitinases (CHI), peroxidases (POX), polyphenoloxidases (PPO), lipoxygenases (LOX) e phenylalanine ammonia lyases (PAL), in addition the concentration of malondialdehyde (MDA). For each of the challenging pathogen *Xanthomonas gardneri* (*Xg*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), and *Alternaria solani* (*As*), two experiments were schematized one for quantifying the severity and the other for obtaining samples for biochemical analyzes. Antagonists were applied to the plants by seed microbiolization and also by soil drenching five days before inoculation of the challenging pathogen and JA was sprayed on tomato plants 48 h before inoculation. Treatments UFV618, UFV592, UFV252 and the JA significantly reduced AACPMB, AACPID, and AACPP, except for plants inoculated with *As* for the treatment UFV618 no significant reduction of AACPPP compared to the control. The results indicate that for plants inoculated with *Xg*, the application of the antagonist UFV618 resulted in higher enzyme activities CHI and LOX; higher enzyme activities PPO, CHI, and LOX for the plants treated with the antagonists UFV592 and UFV252 and enzymes GLU, CHI, POX, PPO, and PAL for use JA. For plants inoculated with *Fol*, applying antagonists UFV618 and UFV592 resulted in higher enzyme activities CHI and LOX, beyond these enzymes major activities of POX and PAL for plants sprayed with AJ and enzymes PPO, PAL, and CHI for plants in which it was applied antagonist UFV252. And for plants inoculated with *As*, the application of the antagonist UFV618 not resulted in increased activity of any enzyme defense; major activities of the enzymes CHI and PAL for the plants treated with the antagonist UFV592 and enzymes PPO e PAL for applying the antagonist UFV252, beyond these enzymes major activities of LOX to plants sprayed with JA. For plants inoculated with *Xg*, *Fol*, and *As* at least one collection time the concentration of MDA in control was higher in comparison to treatments UFV618, UFV592, UFV252, and JA. Indicating greater damage membranes in control treatment which corroborates with the highest severity observed in this treatment. It can be studied as antagonists inducing systemic resistance in tomato plants, the following evidences: i) the spatial separation between the antagonist and the pathogen *Xg* and *As*, which excludes the direct antagonism; ii) in the selection process of the antagonists, these were effective against various pathogens, a characteristic of inducing resistance is not specificity of protection; and iii) antagonists in this study were able to increase the activity of defense enzymes in both plants not inoculated as to inoculated with *Xg*, *Fol*, and *As*.

1. Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma olerícola pertencente à família *Solanaceae* e cultivada em âmbito mundial (FILGUEIRA, 2000), sendo a cultura suscetível a mais de 200 doenças tanto em pré como em pós-colheita (KUROZAWA; PAVAN, 1997; AGRIOS, 2005). Em virtude da alta suscetibilidade do tomateiro a doenças, são grandes as quantidades de agrotóxicos empregados para o seu controle (LOPES; SANTOS, 1994; KUROZAWA; PAVAN, 1997). Dentre os problemas oriundos do uso abusivo de agrotóxicos, pode-se citar a seleção de populações de microrganismos resistentes aos princípios ativos, a redução ou mesmo a eliminação da microbiota benéfica presente no solo, a contaminação de aquíferos e o longo tempo de persistência e permanência de alguns desses compostos no solo e, ou, em órgãos vegetais (ZAMBOLIM, 2001; CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003).

Para culturas em que não há agrotóxicos registrados para o controle de algumas doenças ou para aquelas em que os produtos registrados não são eficazes, como no caso das murchas-vasculares e bacterioses, o controle biológico apresenta-se como uma alternativa viável. Para a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* Schl. f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen, há um produto registrado para a cultura do tomate, cujo ingrediente ativo é o metam-sódico, que é recomendado para o tratamento do solo em pré-plantio (AGROFIT, 2012). Para o complexo de bactérias que causam a mancha-bacteriana do tomateiro, a saber *Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans* (JONES *et al.*, 2004), só há registros de produtos à base de cobre apenas para *X. vesicatoria* (AGROFIT, 2012). Para as demais espécies de bactérias, não há qualquer produto registrado.

Grande quantidade de fungicida é dispendida no controle da pinta-preta, causada por *Alternaria solani* Sorauer (VALE *et al.*, 1992). Fungicidas são usados irracionalmente e em altas doses contaminando o ambiente e prejudicando a saúde dos aplicadores e dos consumidores, geralmente para o controle da pinta-preta, os campos são pulverizados de sete a dez vezes por ciclo da cultura, sem considerar os riscos ou se as condições ambientais são favoráveis à ocorrência da doença (PATTERSON; NOKES, 2000). Em uma pesquisa realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), amostras feitas em frutos indicaram que os níveis de resíduos de agrotóxicos estavam acima do limite estabelecido pela legislação (ANVISA, 2008).

Alguns métodos de controle, como o biológico e, ou, o uso de indutores de resistência, devem ser pensados como ferramentas a serem incorporadas ao manejo integrado de doenças do tomateiro, implicando no uso racional do controle químico e, ou, quando o mesmo não for possível ou ineficiente (El-HENDAWY *et al.*, 2005; NAFIE *et al.*, 2011). Há relatos na literatura de antagonistas procariotas, promovendo o biocontrole de doenças em plantas (ALABOUVETTE, 1995; RYAN *et al.*, 2008), inclusive induzindo resistência sistêmica induzida (van LOON *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2004).

Diversos microrganismos, bem como alguns componentes celulares ou seus produtos, podem atuar indiretamente sobre patógenos, ou seja, ativando mecanismos latentes de defesa em plantas (SILVA *et al.*, 2004; ROMEIRO *et al.*, 2005). Porém, o controle propriamente dito não é devido à ação direta de fatores antimicrobianos, mas, sim, na capacidade do indutor em sensibilizar a planta e esta ser capaz de ativar mecanismos de defesa estruturais e, ou, bioquímicos latentes em resposta ao ataque de um determinado patógeno (KUC, 2001).

O ácido jasmônico e seus derivados jasmonatos são considerados como indutores de resistência em plantas, atuando como moléculas sinalizadoras de respostas iniciais a estresses de origem biótica e ou abiótica (SCHALLER; STINTZI, 2009). A importância do ácido jasmônico no processo de defesa de plantas a patógenos surgiu a partir da sua aplicação em Solanáceas, desencadeando proteção local e sistêmica à infecção de patógenos (COHEN *et al.*, 1993). No patossistema *X. campestris* pv. *pruni*-pereira houve maior expressão dos genes relacionados com a patogênese pela aplicação do ácido jasmônico do que pelo ácido salicílico (SHERIF *et al.*, 2012). Em um estudo com cultura de células de melão, verificou-se que a aplicação do ácido jasmônico aumentou o nível endógeno desse hormônio e a atividade de algumas enzimas de defesa (NAFIE *et al.*, 2011).

Na resistência induzida há um aumento na capacidade de defesa da planta, desencadeada por específicos estímulos biológicos e químicos (van LOON *et al.*, 1998). A redução de doenças pela resistência sistêmica induzida, promovida por rizobactérias ou pelos jasmonatos, tem sido acompanhada pelo aumento na atividade de um grande número de enzimas de defesa (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). A lipoxigenase (LOX) está associada com o metabolismo dos lipídeos e durante a peroxidação de lipídeos pode ocorrer a ativação de respostas de defesa em plantas, incluindo inibição direta do patógeno e acumulação de fitoalexinas (ALAMI *et al.*,

1999), a peroxidase (POX) e a polifenoloxidase (PFO) catalisam a formação de lignina (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996) e a fenilalanina amônia-liase (FAL) está envolvida na biossíntese de fitoalexinas e compostos fenólicos (KLESSIG; MALAMY, 1994). As proteínas relacionadas à patogênese, como a β -1,3-glucanase e a quitinase ao se acumularem nos tecidos vegetais infectados por patógenos fúngicos são capazes de degradar a parede celular deles (KEEN; YOSHIKAWA, 1983). Além disso, os oligossacarídeos liberados da parede celular fúngica a partir da atuação dessas enzimas podem induzir resistência no hospedeiro (DANA *et al.*, 2006).

O presente trabalho teve como objetivos estudar o efeito da aplicação de antagonistas procariotas rizosféricos e do ácido jasmônico na redução da severidade da mancha-bacteriana, da murcha-de-fusário e da pinta-preta do tomateiro, enfatizando a atividade de enzimas de defesa e a concentração do aldeído malônico.

2. Material e métodos

2.1. Origem dos microrganismos, cultivo e preservação

A bactéria patogênica *Xanthomonas gardneri* (*Xg*) (ex Sutic 1957) Jones *et al.* (2006) foi obtida de tomateiro em uma lavoura comercial com sintomas de mancha-bacteriana no município de Coimbra, Minas Gerais, Brasil e identificado por meio do perfil de banda gerados por BOX-PCR (LOUWS *et al.*, 1995). Os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* Schl. f.sp. *lycopersici* (*Fol*) (Sacc.) Snyder and Hansen (raça 2) e *Alternaria solani* (*As*) Sorauer foram obtidos da coleção de fungos da Clínica de Doenças de Plantas da UFV e da coleção de patógenos do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos da UFV, respectivamente. Os antagonistas previamente selecionados como agentes de biocontrole para doenças de plantas (SILVA *et al.*, 2004; ROMEIRO *et al.*, 2005; MACAGNAN *et al.*, 2006; MACAGNAN *et al.*, 2008) foram identificados como *Bacillus cereus* (UFV592) (FRANKLAND; FRANKLAND, 1887) por análise de ácidos graxos (ROMEIRO *et al.*, 2005) e *Streptomyces setonii* (UFV618) (MILLARD; BURR, 1926; WAKSMAN, 1953) pela sequência do fragmento do gene 16S rDNA (MACAGNAN *et al.*, 2006). O isolado UFV252 ainda não foi identificado. As bactérias UFV592 e UFV252 e *Xg* foram cultivadas em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e o actinomiceto UFV618 em extrato de solo-ágar (PRAMER; SCHMIDT, 1964). Os

fungos fitopatogênicos *Fol* e *As* foram cultivados em BDA (batata-dextrose-ágar) (DHINGRA; SINCLAIR, 1985). Quando necessários, os microrganismos foram recuperados da coleção do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. As culturas bacterianas foram preservadas em glicerina (30%), em ultrafreezer, a -80 °C (ROMEIRO, 2005) e os fungos foram preservados em papel de filtro (DHINGRA; SINCLAIR, 1985).

2.2. Aplicação dos antagonistas e pulverização com ácido jasmônico em plantas de tomateiro

Os antagonistas UFV618, UFV592 e UFV252 foram aplicados nas plantas por microbiolização de sementes e encharcamento do solo. A densidade ótica de 540 nm foi ajustada para 0,5 (aproximadamente 5×10^{10} UFC mL⁻¹), adicionando solução salina (0,85%) ao crescimento bacteriano. Sementes de tomateiro (cultivar Santa Clara) foram microbiolizadas com as suspensões de cada um dos isolados por 12 horas e, em seguida, semeadas em vasos. Cinco dias antes da inoculação com *Xg*, foram adicionados 50 mL da suspensão de cada antagonista por vaso.

Nos tratamentos em que as plantas foram atomizadas com AJ, cada planta com 35 dias após a semeadura foi atomizada com 25 mL de uma solução de AJ (Sigma-Aldrich, São Paulo), na concentração de 0,5 mM, às 48 horas antes da inoculação com os patógenos *Xg*, *Fol* e *As*. Após a aplicação do AJ, as plantas permaneceram em câmaras fechadas por um período de 12 horas. Plantas pulverizadas com água destilada e sementes não microbiolizadas serviram como tratamento-controle. Plantas pulverizadas com AJ e os demais tratamentos permaneceram em câmaras separadas.

2.3. Crescimento das plantas de tomateiro

Foram realizados seis experimentos; nos experimentos 1, 2 e 3 avaliou-se, respectivamente, a severidade da mancha-bacteriana, da murcha-de-fusário e da pinta-preta; nos experimentos 4 e 6 foram obtidas amostras de folhas de tomateiro inoculadas com *Xg* e *As*; e no experimento 5 foram obtidas amostras de caules de tomateiro inoculadas com *Fol*; a biomassa vegetal foi utilizada para as análises bioquímicas. Todos os experimentos foram conduzidos em vasos de plástico

contendo 2 dm³ de substrato, exceto nos experimentos 2 e 5 em que os vasos continham 5 dm³ de substrato. O substrato utilizado foi uma mistura de solo esterilizado, húmus e areia, na proporção 3:1:1 (v:v). Para cada dm³ de substrato foi adicionado 1,63 g de fosfato de cálcio monobásico. Foram semeadas dez sementes por vaso. Após emergência, foram deixadas duas plantas por vaso, exceto para os experimentos 2 e 5, em que foram deixadas seis plantas por vaso. Quinze dias após semeadura, as plantas de tomateiro, em cada vaso, receberam 100 mL de solução nutritiva, contendo, em mg L⁻¹, 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de ureia, 0,27 de NH₄MO₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de ZnSO₄, 1,74 de CuSO₄.5H₂O, 4,10 de MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bisódico. A solução também foi aplicada na segunda e na terceira semana após semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa de 75%) e irrigadas diariamente.

2.4. Inoculação das plantas de tomateiro com *X. gardneri* e avaliação da severidade da mancha-bacteriana

Plantas com o quinto par de folhas completamente desenvolvido, da base para o ápice, foram atomizadas com uma suspensão de inóculo de *Xg* (OD₅₄₀= 0,15; aproximadamente 2 × 10⁸ UFC mL⁻¹) com auxílio de um atomizador De Vilbs n^o 15. As plantas foram acondicionadas 24 horas antes e depois da inoculação com *Xg* em câmara úmida, a 26 °C. Posteriormente, as plantas foram levadas para casa de vegetação até o aparecimento dos sintomas da mancha-bacteriana. A severidade nos terços inferior, médio e superior de cada planta foi avaliada aos 7, 12 e 18 dias após inoculação (dai), utilizando a escala diagramática proposta por Mello *et al.* (1997). Em cada um dos terços, escolheu-se a folha com maior severidade. Após as avaliações, obteve-se a média dos valores de severidade das folhas dos três terços para as duas plantas das repetições de cada tratamento. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso da mancha-bacteriana (AACPMB), de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1997).

2.5. Inoculação das plantas de tomateiro com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e avaliação da severidade da murcha-de-fusário

Plantas de tomateiro com o quinto par de folhas completamente desenvolvido, da base para o ápice, foram inoculadas com uma suspensão de conídios de *Fol* na concentração de $1,3 \times 10^7$ conídios mL⁻¹. As plantas foram retiradas dos vasos e o sistema radicular foi cuidadosamente lavado em água corrente de torneira e seccionado 1 cm a partir do ápice. Em seguida, as raízes foram submersas por 3 min na suspensão de conídios e replantadas (REIS *et al.*, 2005). A severidade da murcha-de-fusário foi avaliada aos 10, 15 e 25 dai utilizando a escala de notas proposta por De Cal *et al.* (1995), em que: 1 = plantas sem sintomas; 2 = folhas baixas amareladas; 3 = folhas baixas mortas e algumas folhas superiores amareladas; 4 = folhas baixas mortas e algumas superiores murchas; e 5 = planta morta. A partir das notas obtidas, calculou-se o índice da murcha-de-fusário (IMF) por meio da fórmula proposta por McKinney (1923):

$$(ID\%) = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{5 \times n} \times 100$$

em que A, B, C, D e E = número de plantas com as notas 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente; n = número total de plantas avaliadas (n = A + B + C + D + E), multiplicado pela nota máxima da escala de notas.

Os dados do IMF foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso do índice da murcha-de-fusário (AACPIMF), de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1997).

2.6. Inoculação das plantas de tomateiro com *A. solani* e avaliação da severidade da pinta-preta

Para a esporulação de *As*, o fungo foi cultivado em meio V8 (200 mL de V8[®], 20 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada), a 25 °C, no escuro, sob agitação durante sete dias. Após esse período, a massa de micélio foi triturada em liquidificador e a suspensão depositada em meio BDA (pH 6,5) em placas de Petri, as quais permaneceram em câmaras de crescimento tipo B.O.D., a 25°C, sob luz negra com 12 horas

de fotoperíodo (RODRIGUES *et al.*, 2010). Plantas de tomateiro com o quinto par de folhas completamente desenvolvido, da base para o ápice, foram pulverizadas com uma suspensão de conídios de *As* na concentração de $5,0 \times 10^3$ conídios mL⁻¹, com auxílio de um depressurizador De Vilbs nº 15. Após inoculação, as plantas ficaram por 24 horas em câmara úmida, a 26 °C. A severidade da pinta-preta foi avaliada aos 4, 7 e 11 dai utilizando-se a escala diagramática proposta por Boff *et al.* (1991). Todas as folhas de cada planta foram utilizadas para quantificar a severidade da pinta-preta, obtendo-se a média da severidade das folhas para as duas plantas da repetição de cada tratamento. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso da pinta-preta (AACPPP), de acordo com a fórmula proposta por Shaner e Finney (1997).

2.7. Determinação da atividade de enzimas de defesa e da concentração de aldeído malônico

Determinou-se a atividade das enzimas β -1,3-glucanases (GLU, EC 3.2.1.39), quitinases (QUI, 3.2.1.14), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1), lipoxigenases (LOX, EC 1.13.11.12) e fenilalanina amônia-liases (FAL, EC 4.3.1.5), bem como a concentração de aldeído malônico (MDA), em amostras de folhas ou de caules de plantas de tomateiro inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As*.

Para *Xg*, amostras de folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas aos 2, 5 e 11 dai. Para *Fol*, amostras de caule das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas aos 2, 7 e 20 dai. Para *As*, amostras de folhas das plantas das repetições de cada tratamento foram coletadas aos 2, 6 e 10 dai. Amostras de folhas ou de caules das plantas não inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As* também foram coletadas nas mesmas épocas das inoculações das plantas com esses três patógenos e serviram como tratamento-controle. As amostras de folhas e de caule foram armazenadas individualmente em papel alumínio, imediatamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer, a -80 °C para posterior análise.

Para obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas GLU, QUI, POX, PFO e FAL, amostras de 0,3 g de tecido foliar ou de caule foram maceradas com N₂ líquido, em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em

2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF). O homogeneizado foi centrifugado a $2.0000 \times g$ por 25 min, a 4 °C, e os sobrenadantes foram usados para as determinações enzimáticas.

A atividade da GLU foi determinada conforme descrito por Lever (1972), com modificações. A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 230 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 µL do substrato laminarina (Sigma-Aldrich, São Paulo), na concentração de 4 mg/mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 45 °C, por 30 min. Após o período de incubação, determinou-se a quantidade de açúcares redutores por meio da adição de 250 µL ácido dinitrosalicílico à mistura e, em seguida, incubada em banho-maria, por 15 min, a 100 °C. A reação foi interrompida pelo resfriamento das amostras em banho de gelo até a temperatura de 30 °C. Nas amostras-controle, a mistura de reação foi igual, exceto que o extrato vegetal foi adicionado após o aquecimento da mistura a 100 °C. A absorbância do produto liberado pela GLU foi medida a 540 nm e a atividade foi expressa em unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da QUI foi determinada pelo método de Roberts e Selitrennikoff (1988), modificado por Harman *et al.* (1993). A reação foi iniciada pela adição de alíquotas de 20 µL do sobrenadante a uma mistura composta de 470 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 10 µL do substrato *p*-nitrofenil- β -D-N-N'-diacetilquitobiose (Sigma-Aldrich, São Paulo) na concentração de 2 mg/mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria, a 37 °C, por 2 horas. A reação foi interrompida com adição de 500 µL de 0,2 M de carbonato de sódio. Nas amostras-controle, apenas o carbonato de sódio foi adicionado depois da adição do extrato à mistura de reação e as amostras foram incubadas em banho-maria, a 37 °C, por 2 horas. A absorbância do produto final, liberado pela QUI, foi determinada a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de $7 \times 10^4 \text{ mM cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da QUI, a qual foi expressa em μmol de *p*-nitrofenil, produzido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia de Kar e Miashra (1976). Uma mistura de 950 µL de água destilada, 750 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 600 µL de pirogalol e 600 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM foi adicionada a 20 µL do extrato. A absorbância foi medida a 420 nm em espectrofotômetro a cada 10 s, durante 1 min após adição do extrato à mistura, totalizando cinco leituras. O coefi-

coefficiente de extinção molar de $2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da POX (CHANCE; MAEHLEY, 1955), a qual foi expressa em mmol de purpurogalina produzida por $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. Durante todo o processo, os tubos de microcentrífuga foram cobertos com papel alumínio para proteger a mistura da oxidação pela luz. A atividade da PFO foi determinada à semelhança da POX, exceto que o peróxido de hidrogênio não foi usado na mistura.

A reação da FAL foi iniciada após a adição de $100 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato a uma mistura contendo $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão TRIS-HCl 25 mM (pH 8,8) e $400 \text{ }\mu\text{L}$ de L-fenilalanina 100 mM . A mistura da reação foi incubada em banho-maria, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 4 horas. Nas amostras-controle, o extrato foi substituído por $900 \text{ }\mu\text{L}$ do tampão Tris-HCl. A reação foi finalizada pela adição de $60 \text{ }\mu\text{L}$ de HCl 6 N . A absorbância dos derivados do ácido *trans*-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ZUCKER, 1965) foi usado para calcular a atividade das FAL, a qual foi expressa em $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Para obtenção do extrato para determinação enzimática da LOX, $0,2 \text{ g}$ de tecido foliar ou caulinar foi macerado com N_2 líquido em almofariz. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) contendo Triton-X 1% (v/v) e 1% de PVP. O homogeneizado foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 10 min , a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi usado como extrato para determinação da atividade da LOX. A reação foi iniciada após adição de $20 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato a uma mistura contendo $1.000 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e $7 \text{ }\mu\text{L}$ do substrato linoleato de sódio 10 mM . A atividade da LOX foi determinada conforme metodologia descrita por Axelrod *et al.* (1981). A absorbância do produto, liberado pela LOX, foi medida em espectrofotômetro a 234 nm . O coeficiente de extinção molar de $25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para determinar a atividade da LOX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

A quantificação da concentração de MDA foi realizada conforme descrito por Cakmak e Host (1991). As amostras de folhas ou de caules foram pesadas e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) $0,1\%$ (p/v). O extrato bruto foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 min . Uma alíquota de $250 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante foi adicionada a um tubo de microcentrífuga contendo $750 \text{ }\mu\text{L}$ de

solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em TCA 20% e, em seguida, incubado por 120 min, a 90 °C, sob agitação. A reação foi interrompida em gelo. Logo após, as amostras foram centrifugadas a $13.000 \times g$ durante 4 min. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação da concentração de MDA com leitura da absorbância a 540 nm.

2.8. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Foram realizados seis experimentos. Nos experimentos 1, 2 e 3 foram avaliadas as severidades da mancha-bacteriana, da murcha-de-fusário e da pinta-preta, respectivamente. Para avaliar as severidades das doenças, os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e cinco repetições. Com os dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada uma das doenças. As AACPD foram comparadas entre os tratamentos, utilizando-se o teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Os experimentos 4, 5 e 6 foram usados para a obtenção de amostras para as análises bioquímicas nas plantas de tomateiro inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As*, respectivamente. Para as análises bioquímicas, os experimentos foram instalados em DIC em esquema fatorial 5×2 , com quatro repetições. Os fatores estudados foram: três antagonistas (UFV618, UFV592 e UFV252), AJ e o controle (ausência dos antagonistas e não pulverizadas com AJ) e plantas não inoculadas ou inoculadas com os patógenos. Os dados das atividades da GLU, QUI, POX, PFO, LOX e FAL e da concentração de MDA foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos plantas não inoculadas e inoculadas com os patógenos, para cada época de coleta, foram comparadas pelo teste-t ($P \leq 0.05$). Compararam-se também, para cada época de coleta, as médias dos tratamentos UFV618, UFV592 e UFV252 e o AJ para as plantas não inoculadas e inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As*, com os respectivos tratamentos-controle para as plantas não inoculadas e inoculadas com *Xg*, *Fol* e *As*, pelo teste Dunnett ($P \leq 0.05$). Em todos os experimentos cada unidade experimental correspondeu a um vaso plástico contendo duas plantas de tomateiro, exceto nos experimentos 2 e 5, em que cada vaso continha seis plantas de tomateiro. Para análises estatísticas, utilizou-se o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. Resultados

3.1. Patossistema tomateiro - *X. gardneri*

Os três antagonistas (UFV618, UFV252 e UFV 592), bem como o AJ, reduziram significativamente a AACPMB (Figura 1). As reduções da AACPMB com o uso dos antagonistas UFV618, UFV252 e UFV592 e do AJ foram de 42, 55, 57 e 58%, respectivamente, em comparação com o tratamento-controle.

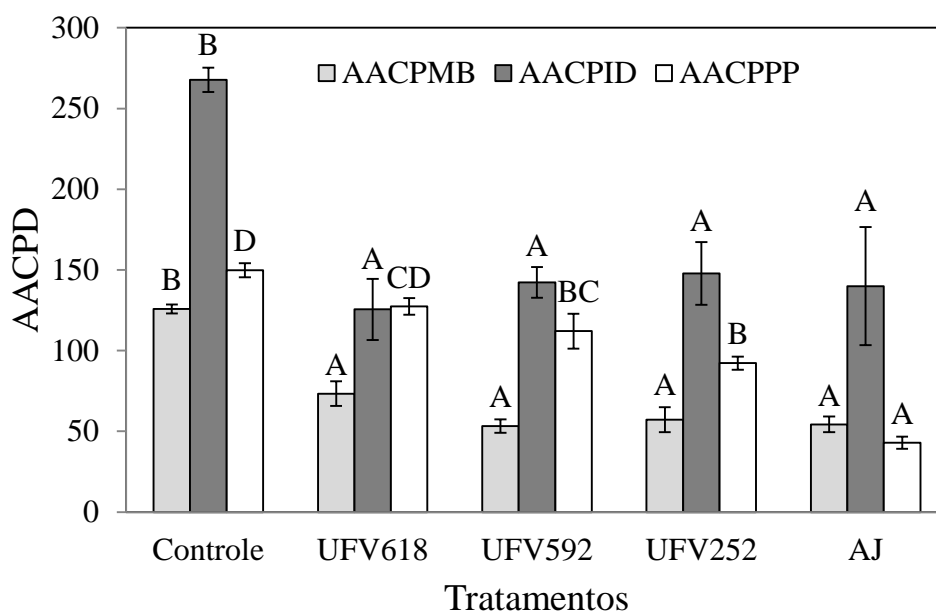


Figura 1 – Área abaixo da curva do progresso da mancha-bacteriana (AACPMB), área abaixo da curva do progresso do índice de doença (AACPID) e área abaixo da curva do progresso da pinta-preta (AACPPP), em plantas de tomateiro inoculadas respectivamente, com *Xanthomonas gardneri*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Alternaria solani*. Os tratamentos foram plantas tratadas com os antagonistas UFV618, UFV592, UFV252 e plantas pulverizadas com ácido jasmônico (AJ). O tratamento-controle correspondeu às plantas sem os antagonistas e não pulverizadas com AJ. Barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste Tukey, $n = 5$.

O efeito dos fatores tratamentos (UFV618, UFV592, UFV252, AJ e controle), da inoculação e das épocas de coleta foram significativos para todas as enzimas e para a concentração de MDA (Tabela 1). Algumas interações duplas e triplas entre os fatores estudados também foram significativas (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos (UFV618, UFV592, UFV252, ácido jasmônico (AJ) e controle), inoculação e épocas de coleta para a atividade das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL), quitinases (QUI), β -1,3-glucanases (GLU), lipoxigenases (LOX) e concentração de aldeído malônico (MDA)

Causas de Variação	Valores de <i>F</i>							
	GL	POX	PFO	FAL	QUI	GLU	LOX	MDA
Tratamentos (T)	4	10,09**	52,14**	10,72**	11,55**	14,67**	3,59**	7,59**
Inoculação (I)	1	39,30**	139,97**	13,79**	27,33**	13,37**	19,46**	12,84**
Épocas de coleta (EC)	3	54,21**	25,58**	5,21**	10,25**	31,34**	108,37**	5,32**
T × I	4	4,24*	2,68*	0,58 ^{ns}	1,11 ^{ns}	4,78**	0,36 ^{ns}	2,02 ^{ns}
T × EC	12	4,35**	7,81**	10,97**	3,90**	6,04**	6,35**	1,54 ^{ns}
I × EC	3	18,10**	15,47**	7,86**	8,01**	4,56**	8,04**	3,20*
T × I × EC	12	1,68 ^{ns}	1,91*	1,63 ^{ns}	1,64 ^{ns}	1,32 ^{ns}	1,70 ^{ns}	3,86**

Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo; e * = 0,05, ** = 0,01.

Para a atividade da GLU, houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Xg* aos 5 dai para os tratamentos AJ e UFV592 e aos 2 dai apenas para o AJ (Figura 2A). Nas plantas não inoculadas, não houve diferença significativa para a atividade da GLU entre os tratamentos e o controle. Nas plantas inoculadas com *Xg*, a atividade da GLU foi maior aos 2 e 5 dai somente para o tratamento AJ em comparação com o tratamento-controle (Figura 2A).

Para todos os tratamentos, exceto o controle, as plantas inoculadas com *Xg* apresentaram maiores atividades da QUI aos 5 dai do que as plantas não inoculadas. Apenas para as plantas do tratamento UFV592 houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Xg* aos 2 dai (Figura 2B). Para as plantas não inoculadas, a atividade da QUI foi maior apenas para o tratamento UFV252 em relação ao controle aos 11 dai. Plantas dos tratamentos UFV618, UFV592 e AJ inoculadas com *Xg* tiveram maior atividade da QUI em relação às plantas do tratamento-controle aos 5 dai e aos 11 dai somente para o tratamento UFV252 (Figura 2B).

Exceto para o tratamento AJ, houve significativamente maior atividade da POX nas plantas inoculadas com *Xg* do que nas plantas não inoculadas aos 2 dai. Apenas para os tratamentos UFV592 e controle aos 5 e 11 dai, respectivamente, houve maior atividade da POX nas plantas inoculadas com *Xg* do que nas plantas não inoculadas (Figura 3A). Nas plantas não inoculadas, a atividade da QUI foi maior para o tratamento AJ do que para o controle aos 2 dai. Para as plantas inoculadas com *Xg*, somente o tratamento AJ resultou em maiores atividades da QUI do que o tratamento-controle aos 2 dai (Figura 3A).

Entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Xg*, a atividade da PFO foi maior aos 2, 5 e 11 dai para os tratamentos UFV618, UFV592 e UFV252. Para o tratamento AJ, a atividade da PFO foi maior aos 2 e 5 dai e no controle somente aos 5 dai (Fig. 3B). Para as plantas não inoculadas, a atividade da PFO foi significativamente maior para os tratamentos UFV592, UFV252 e o AJ do que para o tratamento-controle aos 0 dai; aos 2 dai para os tratamentos UFV618 e UFV252 e aos 5 e 11 dai apenas para o tratamento AJ. Para as plantas inoculadas com *Xg*, houve maior atividade da PFO para os tratamentos UFV592 e UFV252 do que para o tratamento-controle aos 2 dai e para o tratamento AJ aos 5 dai (Figura 3B).

Para as plantas inoculadas com *Xg*, a atividade da LOX foi maior somente para o tratamento UFV592 em relação às plantas não inoculadas aos 2 dai. Já aos 5 dai, a atividade da LOX foi maior para todos os tratamentos, exceto para o tratamento

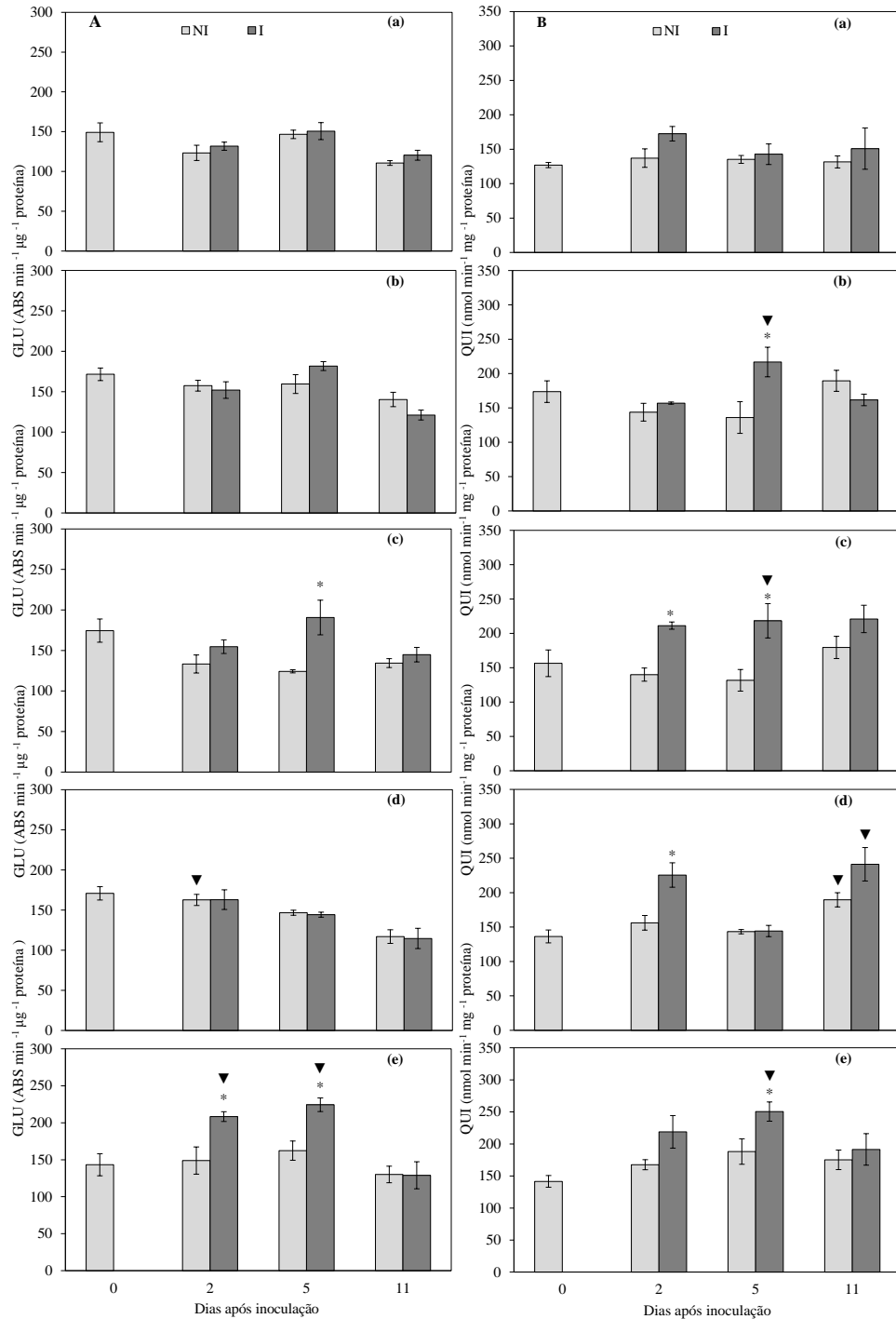


Figura 2 – Atividades de β -1,3-glucanases (GLU) (A) e quitinases (QUI) (B) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Xanthomonas gardneri* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

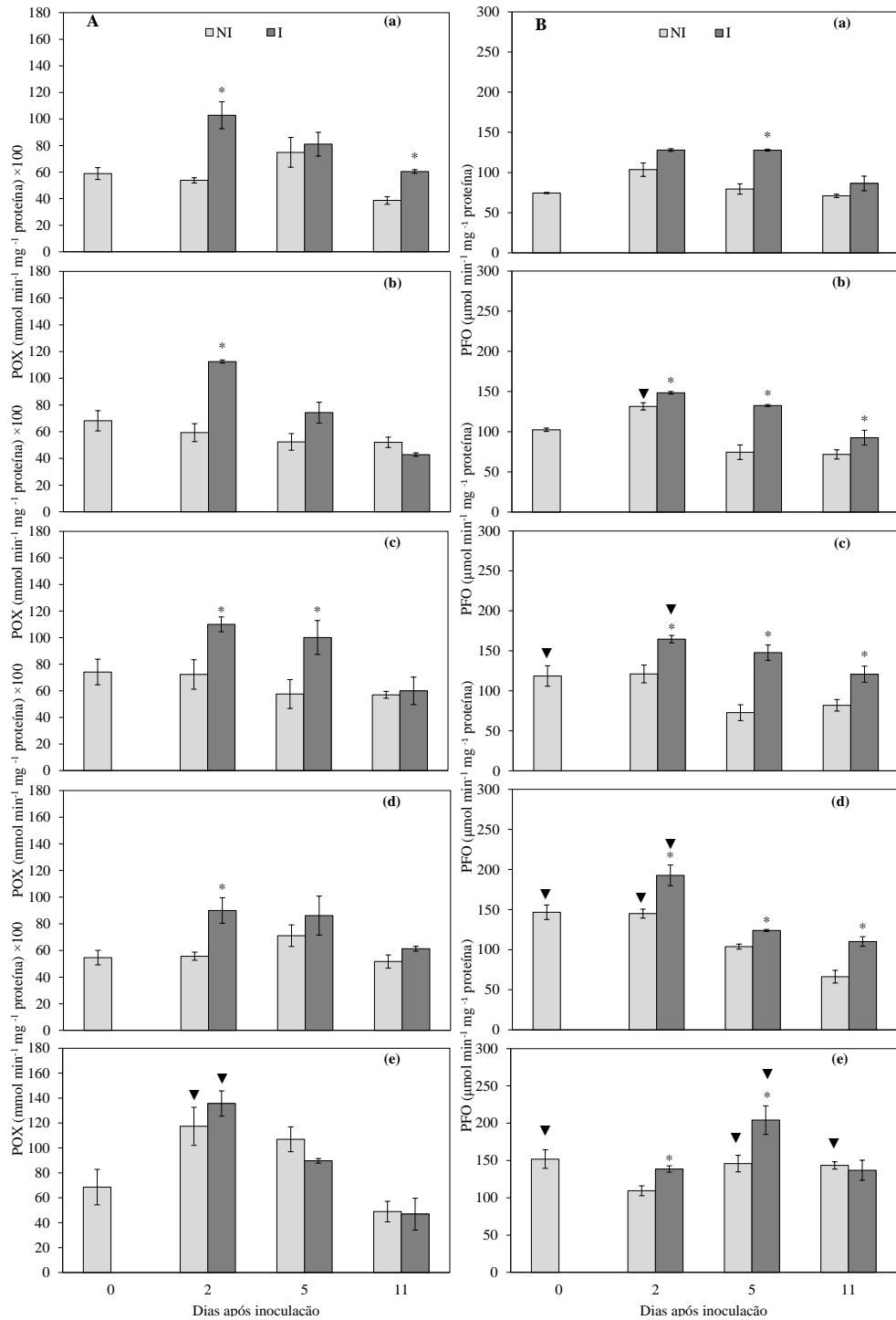


Figura 3 – Atividades de peroxidases (POX) (A) e polifenoloxidas (PFO) (B) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Xanthomonas gardneri* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

AJ e aos 11 dai a atividade da LOX foi maior para as plantas inoculadas com *Xg* para todos tratamentos (Figura 4A). A atividade da LOX foi maior nas plantas não inoculadas do que nas plantas do tratamento-controle ao 0 dai para os tratamentos UFV618 e UFV592 e aos 5 e 11 dai somente para os tratamentos UFV592 e UFV618, respectivamente. Nas plantas inoculadas com *Xg*, a atividade da LOX foi maior para os tratamentos UFV592, UFV252 e UFV618 em relação ao tratamento-controle aos 2, 5 e 11 dai, respectivamente (Figura 4A).

A atividade da FAL foi significativamente maior para as plantas inoculadas com *Xg* em comparação com as plantas não inoculadas aos 2 dai para os tratamentos UFV618 e UFV592 e aos 5 dai para os tratamentos AJ e controle. Aos 11 dai a atividade da FAL foi maior para as plantas inoculadas com *Xg* apenas para o tratamento AJ (Figura 4B). Nas plantas não inoculadas, a atividade da FAL foi maior para os tratamentos UFV592 e UFV252 em relação ao tratamento-controle ao 0 dai e aos 2 e 5 dai apenas para o tratamento AJ. Nas plantas inoculadas com *Xg*, a atividade da FAL foi maior apenas para o tratamento AJ aos 5 dai em relação ao tratamento-controle (Figura 4B).

A concentração de MDA foi significativamente maior nas plantas inoculadas com *Xg* em comparação com as plantas não inoculadas aos 2 dai para o tratamento UFV592; aos 5 dai para os tratamentos UFV618 e UFV592; e aos 11 dai para os tratamentos AJ e controle (Figura 5). Para as plantas inoculadas com *Xg*, a menor concentração de MDA ocorreu apenas para o tratamento UFV252 em relação ao tratamento-controle aos 5 dai. Aos 11 dai, menores concentrações de MDA ocorreram para todos os tratamentos em relação ao tratamento-controle (Figura 5).

3.2. Patossistema tomateiro- *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Os três antagonistas (UFV618, UFV252 e UFV 592), bem como o AJ, reduziram significativamente a AACPIMF (Figura 1). As reduções da AACPID com o uso dos antagonistas UFV592 e UFV252 e do AJ foram de 25, 38 e 71%, respectivamente, em comparação ao tratamento-controle (Figura 1).

O efeito dos fatores tratamentos (UFV618, UFV592, UFV252, AJ e controle) e inoculação não foram significativos apenas para a enzima GLU (Tabela 2). O efeito do fator época de coleta foi significativo para todas as enzimas e para o MDA (Tabela 2). Algumas interações duplas e triplas entre os fatores foram significativas (Tabela 2).

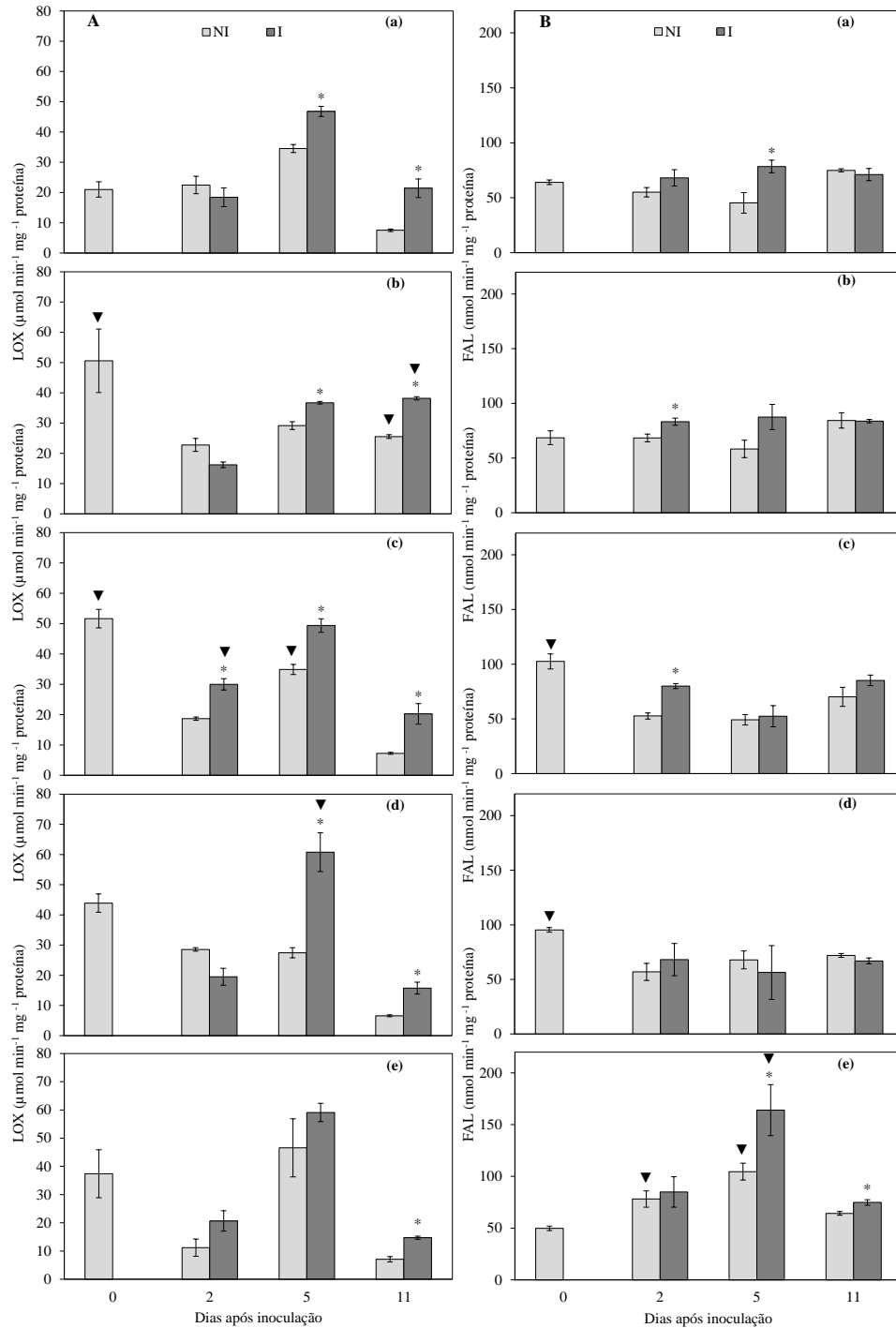


Figura 4 – Atividades de lipoxigenasee (LOX) (A) e fenilalanina amônia liases (FAL) (B) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Xanthomonas gardneri* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

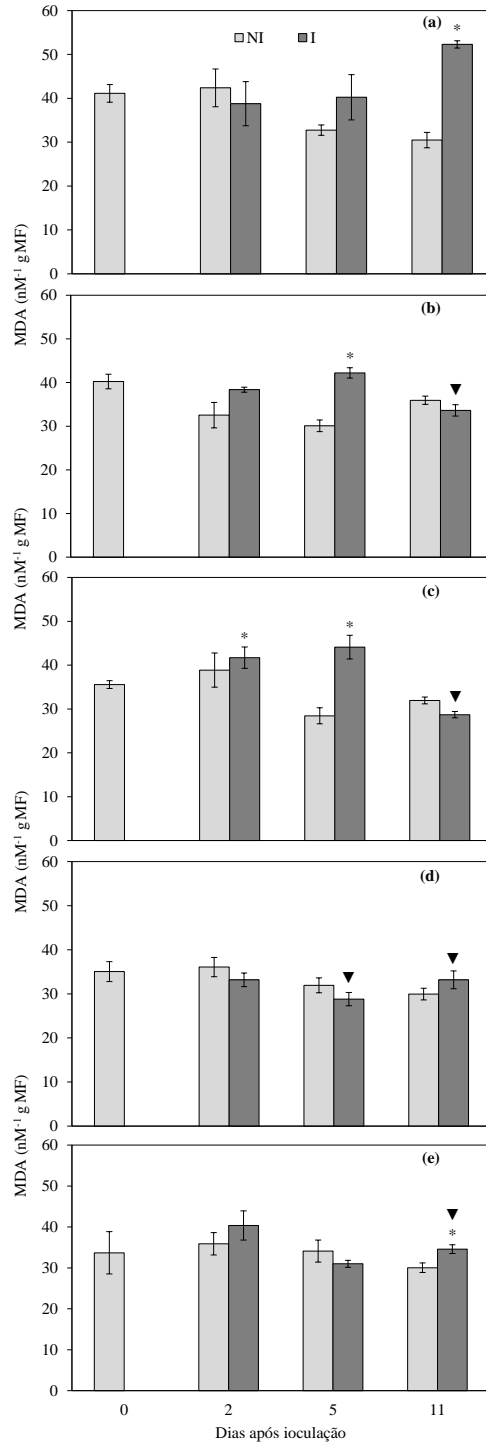


Figura 5 – Concentração do aldeído malônico (MDA) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Xanthomonas gardneri* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnnett*, $n = 4$.

Tabela 2 – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos (UFV618, UFV592, UFV252, ácido jasmônico (AJ) e controle), inoculação e épocas de coleta para a atividade das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL), quitinases (QUI), β -1,3-glucanases (GLU), lipoxigenases (LOX) e concentração de aldeído malônico (MDA)

Causas de Variação	Valores de <i>F</i>							
	GL	POX	PFO	FAL	QUI	GLU	LOX	MDA
Tratamentos (T)	4	7,27 ^{**}	9,80 ^{**}	6,30 ^{**}	4,31 ^{**}	0,12 ^{ns}	43,86 ^{**}	5,35 ^{**}
Inoculação (I)	1	8,04 ^{**}	8,41 ^{**}	16,03 ^{**}	99,61 ^{**}	1,87 ^{ns}	166,49 ^{**}	33,54 ^{**}
Épocas de coleta (EC)	3	135,54 ^{**}	93,63 ^{**}	11,85 ^{**}	329,60 ^{**}	96,32 ^{**}	187,20 ^{**}	32,00 ^{**}
T × I	4	0,91 ^{ns}	2,05 ^{ns}	2,32 ^{ns}	3,03 [*]	0,73 ^{ns}	44,43 ^{**}	1,61 ^{ns}
T × EC	12	1,38 ^{ns}	0,69 ^{ns}	5,91 ^{**}	6,00 ^{**}	0,98 ^{ns}	48,17 ^{**}	1,30 ^{ns}
I × EC	3	1,12 ^{ns}	0,81 ^{ns}	5,64 ^{**}	43,05 ^{**}	0,52 ^{ns}	110,03 ^{**}	10,93 ^{**}
T × I × EC	12	0,92 ^{ns}	1,23 ^{ns}	3,30 ^{**}	3,46 [*]	0,32 ^{ns}	44,88 ^{**}	2,09 [*]

Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo; ^{*} = 0,05, ^{**} = 0,01.

Para as plantas inoculadas com *Fol*, não houve diferença estatística para a atividade da GLU em comparação com as plantas não inoculadas (Figura 6A). Também não houve diferença estatística para a atividade da GLU, entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Fol*, para os tratamentos comparados aos controles, plantas não inoculadas e inoculadas com *Fol*, em nenhuma época de coleta (Figura 6A).

A atividade da QUI foi significativamente superior para as plantas não inoculadas em comparação com as inoculadas com *Fol* aos 7 dai, para os tratamentos UFV618, UFV592 e UFV252, e aos 20 dai, para os tratamentos UFV618, UFV592 e AJ (Figura 6B). Para as plantas não inoculadas, a atividade da QUI foi superior estatisticamente apenas para o tratamento AJ aos 7 dai em comparação com o tratamento-controle. Para as plantas inoculadas com *Fol*, a atividade da QUI foi superior estatisticamente aos 7 dai, para os tratamentos UFV592, UFV252 e AJ, e aos 20 dai, para os tratamentos UFV618 e AJ em comparação com o tratamento-controle (Figura 6B).

Entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Fol*, não ocorreu diferença estatística na atividade da POX, para nenhum dos tratamentos em nenhuma das épocas de coleta (Figura 7A). Para as plantas não inoculadas, a atividade da POX foi maior estatisticamente do que as plantas do tratamento-controle aos 0, 2 e 7 dai somente para os tratamentos UFV252, AJ e UFV618, respectivamente. Para as plantas inoculadas com *Fol*, somente o tratamento AJ resultou em maiores atividades da POX em relação ao controle aos 7 dai (Figura 7A).

Não houve diferença estatística para a atividade da PFO, entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Fol* para nenhum dos tratamentos em nenhuma das épocas de coleta (Figura 7B). Apenas aos 2 dai houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas dos tratamentos UFV592, UFV252 e AJ, comparadas com as plantas-controle. Para as plantas inoculadas com *Fol*, a atividade da PFO foi superior significativamente aos 2 dai, para o tratamento UFV252, e aos 20 dai, para o tratamento AJ (Figura 7B).

A atividade da LOX foi significativamente maior para as plantas inoculadas com *Fol*, em comparação com as não inoculadas aos 2 dai, para todos tratamentos, exceto para o tratamento AJ, e aos 20 dai, para os tratamentos UFV618, UFV592 e o tratamento-controle (Figura 8A). Para as plantas não inoculadas, a atividade da LOX foi maior significativamente aos 7 dai para os tratamentos UFV618, UFV592 e

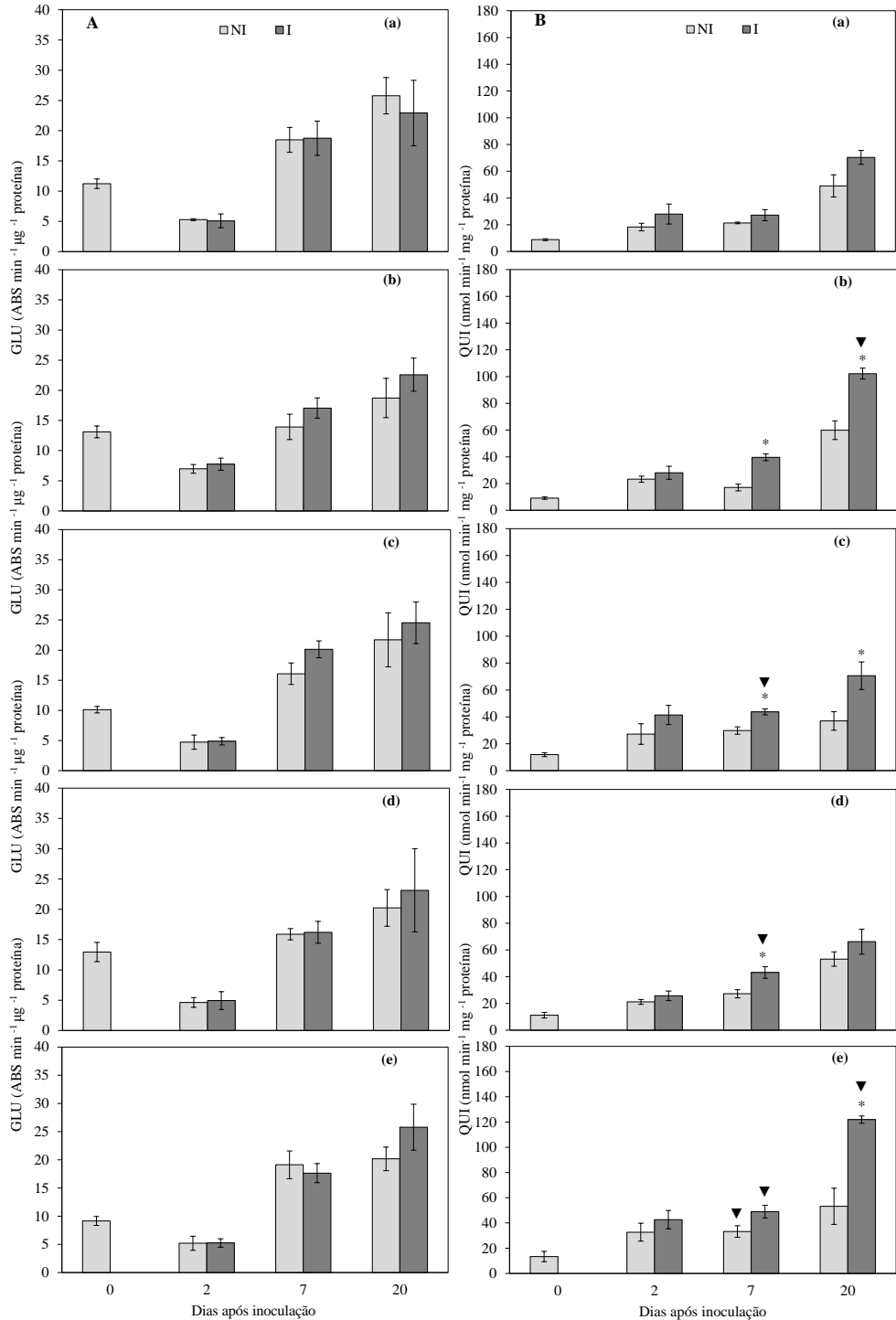


Figura 6 – Atividades de β -1,3-glucanases (GLU) (A) e quitinases (QUI) (B) em caules de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

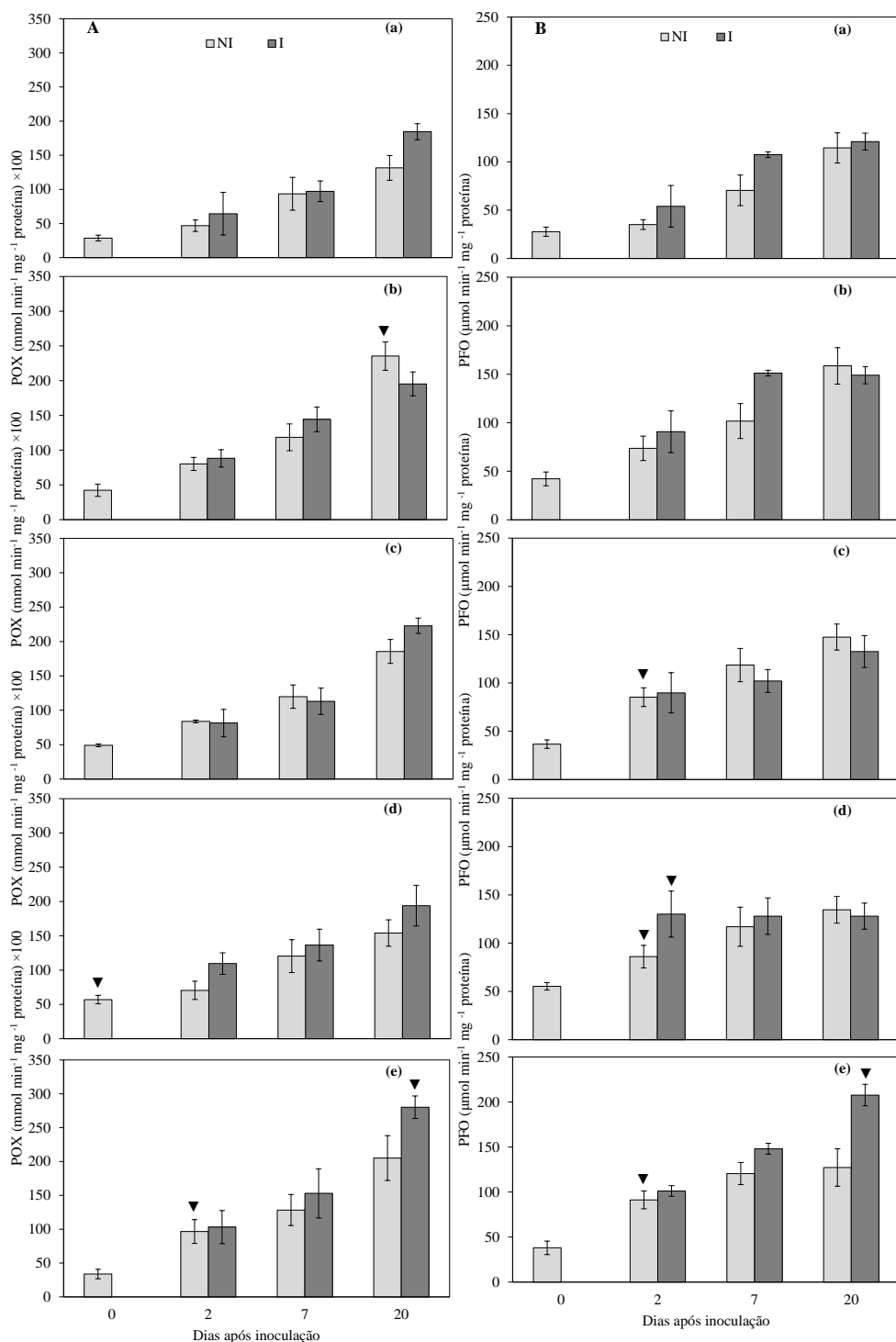


Figura 7 – Atividades de peroxidases (POX) (A) e polifenoloxidasas (PFO) (B) em caules de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnnett*, $n = 4$.

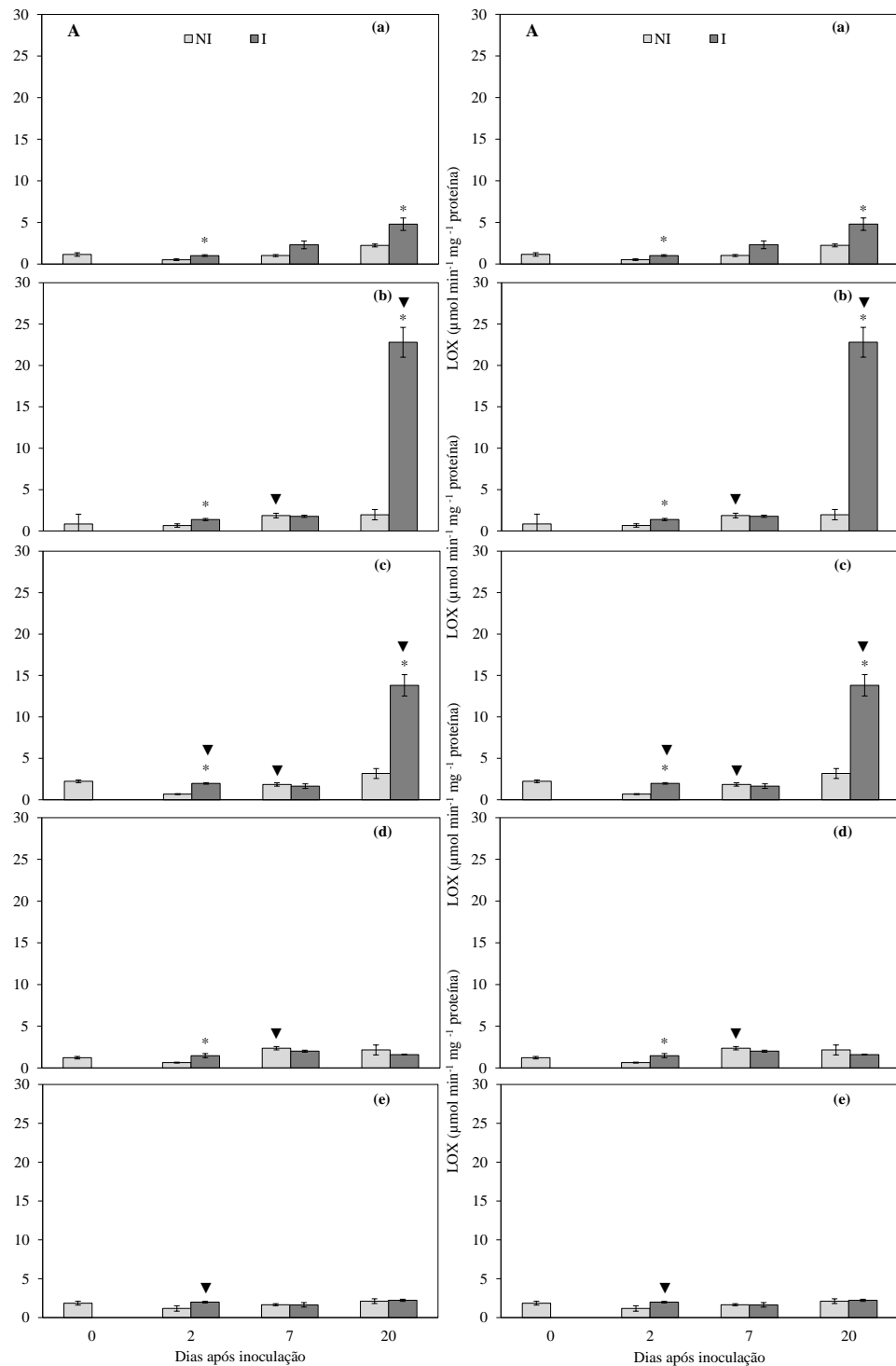


Figura 8 – Atividades de lipoxigenasee (LOX) (A) e fenilalanina amônia liasee (FAL) (B) em caules de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnnett*, $n = 4$.

UFV252, comparadas com as plantas do tratamento-controle. Para as plantas inoculadas com *Fol*, a atividade da LOX foi estatisticamente superior ao tratamento-controle aos 2 dai, para os tratamentos UFV592 e AJ, e aos 20 dai, para os tratamentos UFV618 e UFV592 (Figura 8A).

Para as plantas não inoculadas e inoculadas com *Fol*, a atividade da FAL foi estatisticamente diferente aos 2 e 20 dai, para os tratamentos UFV252 e UFV592, respectivamente; sendo maiores as atividades para as plantas inoculadas com *Fol* em relação às plantas não inoculadas. A atividade FAL foi maior estatisticamente para as plantas não inoculadas comparadas com as plantas inoculadas com *Fol*, aos 7 dai, para os tratamentos UFV618 e AJ, e aos 20 dai, para os tratamentos UFV618, UFV252 e AJ (Figura 8B). Para as plantas não inoculadas, a atividades da FAL foi maior estatisticamente em comparação com as plantas do tratamento-controle no 0 dai, para os tratamentos UFV592 e UFV252, e aos 7 e 20 dai, apenas para os tratamentos UFV618 e AJ, respectivamente. Para as plantas inoculadas com *Fol*, a atividade da FAL maior significativamente em comparação ao controle, aos 7 dai, para o tratamento UFV252, e aos 20 dai, para o AJ (Figura 8B).

A concentração de MDA foi maior estatisticamente para as plantas inoculadas com *Fol* comparadas com as não inoculadas aos 2 dai, para os tratamentos UFV618, AJ e controle, e aos 20 dai, para os tratamentos UFV252 e AJ (Figura 9). A concentração de MDA foi menor estatisticamente para as plantas inoculadas com *Fol*, do que para o tratamento-controle aos 2 dai, para os tratamentos UFV592 e UFV252, e aos 7 dai, para todos os tratamentos (Figura 9).

3.3. Patossistema tomateiro - *A. solani*

Os antagonistas UFV592 e UFV252 e o AJ reduziram significativamente a AACPPP (Figura 1). As reduções da AACPPP com o uso dos antagonistas UFV592 e UFV252 e para o AJ foram de 25, 38 e 71%, respectivamente, em comparação ao tratamento-controle (Figura 1).

O efeito do fator tratamentos (UFV618, UFV592, UFV252, AJ e controle) não foi significativo para a GLU e MDA (Tabela 3). Entretanto, o efeito dos fatores inoculação e época de coleta foram significativos para todas as enzimas e para o MDA (Tabela 3). Algumas interações duplas e triplas entre os fatores foram significativas (Tabela 3).

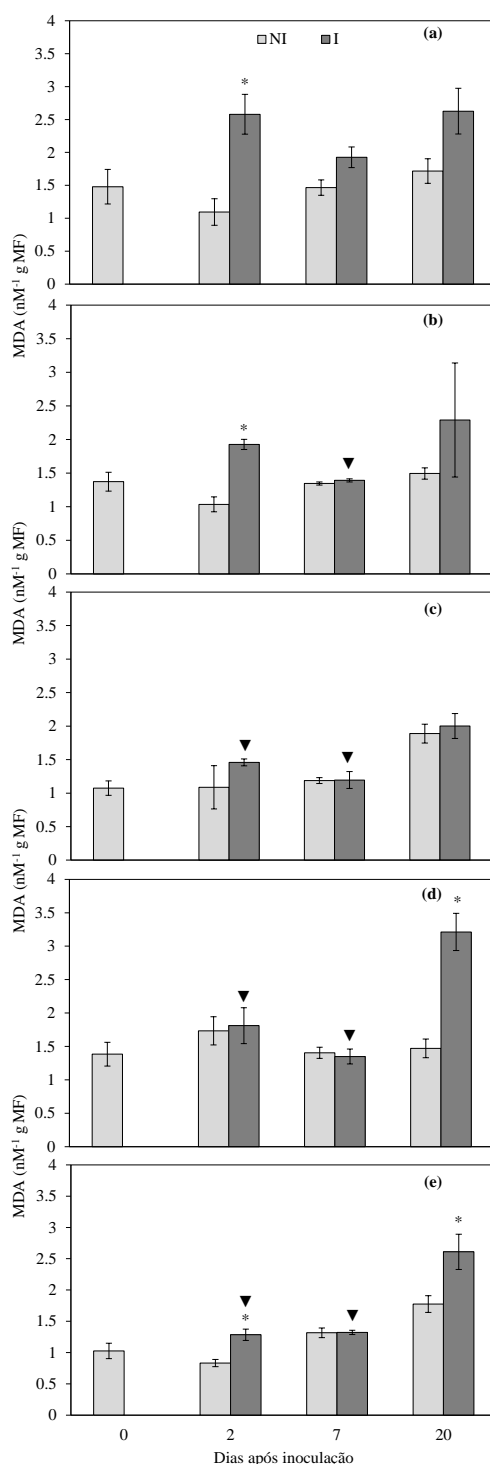


Figura 9 – Concentração do aldeído malônico (MDA) em caules de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

Tabela 3 – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos (UFV618, UFV592, UFV252, ácido jasmônico (AJ) e controle), inoculação e épocas de coleta para a atividade das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amônia-liases (FAL) quitinases (QUI), β -1,3-glucanases (GLU), lipoxigenases (LOX) e concentração de aldeído malônico (MDA)

Causas de Variação	Valores de <i>F</i>							
	GL	POX	PFO	FAL	QUI	GLU	LOX	MDA
Tratamentos (T)	4	2,94*	26,06**	8,49**	5,57**	0,12 ^{ns}	15,84**	1,42 ^{ns}
Inoc. Não inoc. (I)	1	120,57**	46,08**	38,03**	22,57**	18,36**	105,6**	11,20**
Épocas de coleta (EC)	3	153,14**	128,62**	9,09**	82,49**	61,75**	211,5**	24,10**
T × I	4	0,48 ^{ns}	14,37**	0,76 ^{ns}	1,65 ^{ns}	0,99 ^{ns}	2,28 ^{ns}	0,90 ^{ns}
T × EC	12	2,51**	7,19**	12,18**	3,65**	1,46 ^{ns}	6,47**	1,47 ^{ns}
I × EC	3	41,97**	7,83**	7,27**	5,02**	14,23**	47,9**	2,64 ^{ns}
T × I × EC	12	2,65**	12,43**	2,93**	1,58 ^{ns}	1,28 ^{ns}	1,79 ^{ns}	1,05 ^{ns}

Níveis de probabilidade: ^{ns} = não significativo; e * = 0,05, ** = 0,01.

Houve diferença estatística para a atividade da GLU entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *As* aos 6 dai para todos tratamentos, exceto para o tratamento UFV618 (Figura 10A). Não houve diferença na atividade da GLU entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *As* comparados aos respectivos tratamentos-controle, plantas não inoculadas e inoculadas com *As*, para nenhum dos tratamentos (Figura 10A).

A atividade da QUI foi significativamente superior para as plantas inoculadas com *As* em comparação as não inoculadas, aos 2 dai para os tratamentos UFV618 e UFV592, e aos 6 daí, somente para o tratamento UFV252 (Figura 10B). Para as plantas não inoculadas, a atividade da QUI foi superior estatisticamente ao tratamento-controle, somente para o tratamento AJ, aos 6 dai. Para as plantas inoculadas com *As*, aos 2 e 6 daí, a atividade da QUI foi superior ao tratamento-controle para os tratamentos UFV592 e AJ, respectivamente (Figura 10B).

Entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *As*, houve diferença estatística para a atividade da POX aos 6 dai, para todos tratamentos, e aos 10 dai, para os tratamentos UFV618 e AJ (Figura 11A). Para as plantas não inoculadas, a atividade da POX foi maior estatisticamente do que as plantas do tratamento-controle, apenas aos 6 daí, para o tratamento AJ. Para as plantas inoculadas com *As*, não houve diferença na atividade da POX entre os tratamentos e o controle (Figura 11A).

A atividade da PFO foi maior para as plantas inoculadas com *As* comparadas com as não inoculadas, aos 2 dai, apenas para o tratamento AJ, e aos 6 e 10 dai, para os tratamentos UFV252 e para o controle (Figura 11B). Houve diferença significativa para a atividade da PFO, entre as plantas não inoculadas comparadas ao tratamento-controle, no 0 daí, somente para os tratamentos UFV618 e o AJ, e aos 10 dai, para os tratamentos UFV618 e UFV252. A atividade da PFO foi significativamente superior nas plantas inoculadas com *As*, aos 2 e 6 dai, para os tratamentos AJ e UFV252, respectivamente, em comparação com as plantas do tratamento-controle (Figura 11B).

A atividade da LOX foi estatisticamente maior para as plantas inoculadas com *As* em comparação com as não inoculadas, aos 6 dai, para todos os tratamentos, e aos 10 dai, para os tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e AJ (Figura 12A). Para as plantas não inoculadas, a atividade da LOX foi maior no 0 dai, para os tratamentos UFV618 e UFV592. A atividade da LOX foi maior estatisticamente para as plantas inoculadas com *As*, somente aos 6 dai, para o tratamento AJ (Figura 12A).

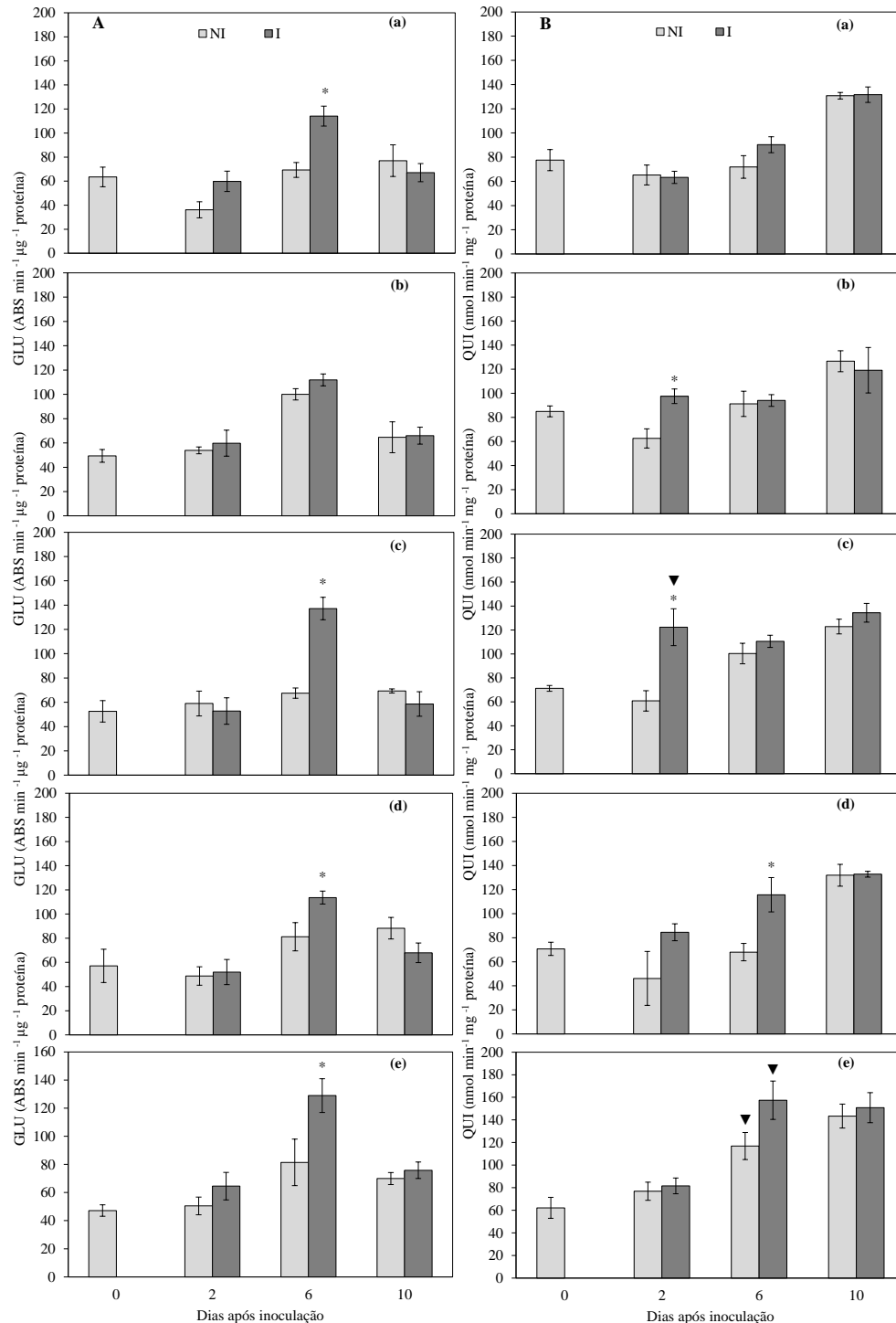


Figura 10 – Atividades de β -1,3-glucanases (GLU) (A) e quitinases (QUI) (B) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Alternaria solani* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

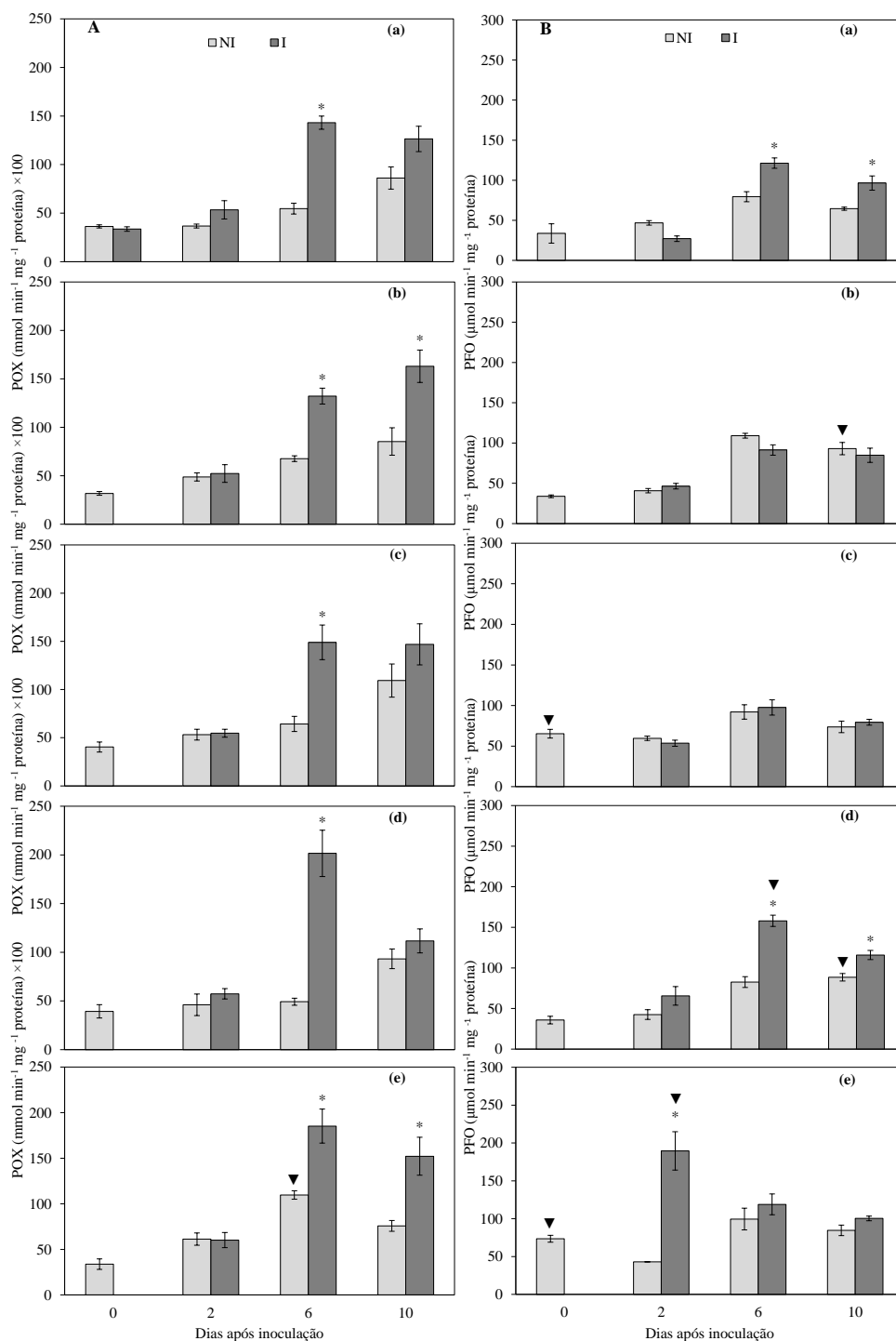


Figura 11 – Atividades de peroxidases (POX) (A) e polifenoloxidases (PFO) (B) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Alternaria solani* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

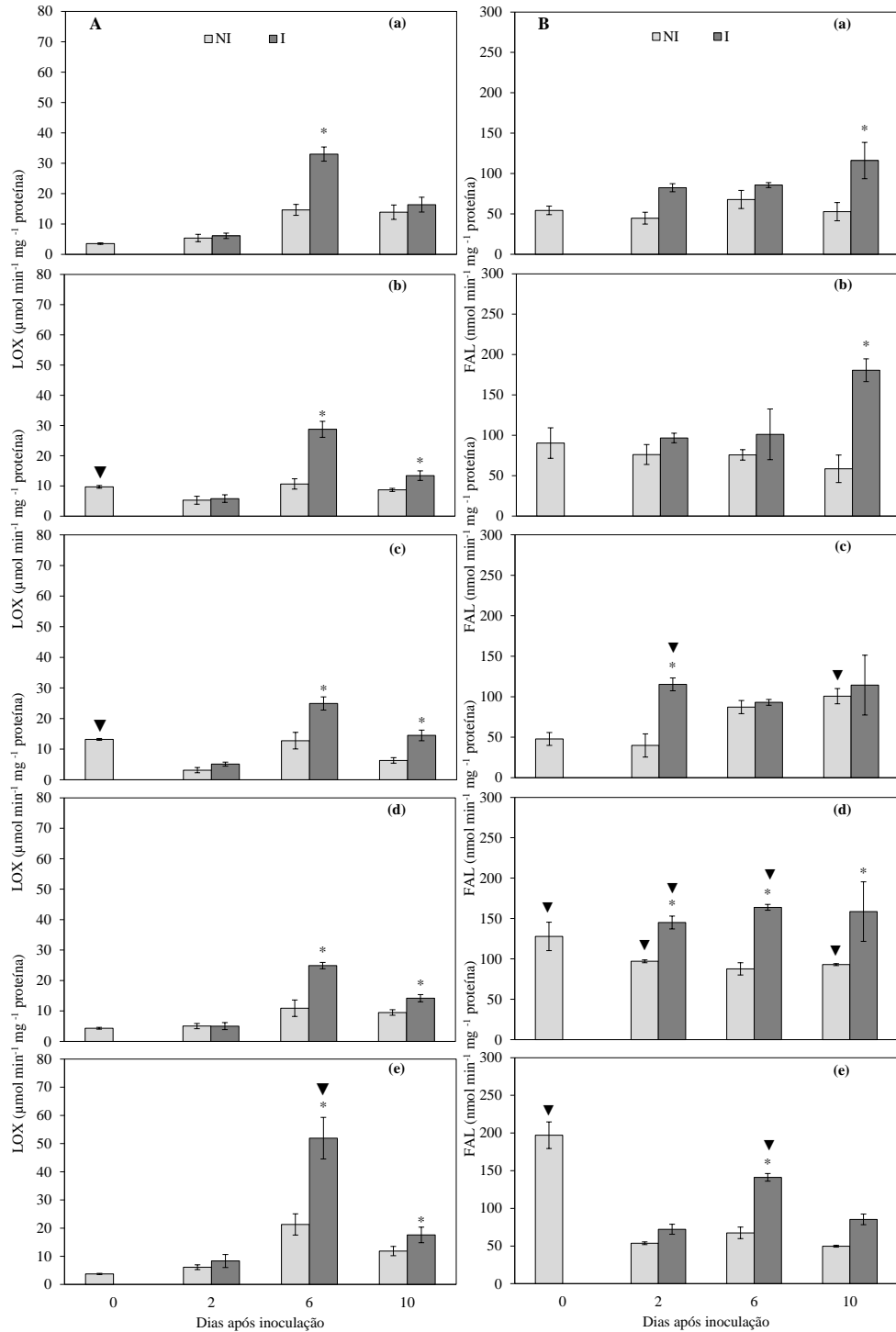


Figura 12 – Atividades de lipoxigenases (LOX) (A) e fenilalanina amônia liases (FAL) (B) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Alternaria solani* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnett*, $n = 4$.

A atividade da FAL foi estatisticamente maior para as plantas inoculadas com *As* em comparação as não inoculadas, aos 2 dai, para os tratamentos UFV592 e UFV252, aos 6 dai, para os tratamentos UFV592 e AJ, e aos 10 dai, para os tratamentos UFV618, UFV252 e o controle (Figura 12B). Para as plantas não inoculadas, as atividades da FAL foram estatisticamente maiores em relação às plantas do tratamento-controle, no 0 dai, para os tratamentos UFV252 e AJ, aos 2 dai, apenas para o tratamento UFV252, e aos 10 dai, para os tratamentos UFV592 e UFV252. Para as plantas inoculadas com *As*, a atividade da FAL foi significativamente maior do que as plantas do tratamento-controle, aos 2 dai, para os tratamentos UFV592 e UFV252, e aos 6 dai, para os tratamentos UFV252 e AJ (Figura 12B).

A concentração de MDA foi estatisticamente maior para as plantas inoculadas com *As* comparadas com as não inoculadas, aos 6 e 10 dai, somente para o tratamento-controle (Figura 13). A concentração de MDA foi menor estatisticamente para as plantas inoculadas com *As*, aos 6 dai, para os tratamentos UFV618 e UFV592, e aos 10 dai, para os tratamentos UFV252 e AJ, em comparação com as plantas do tratamento-controle (Figura 13).

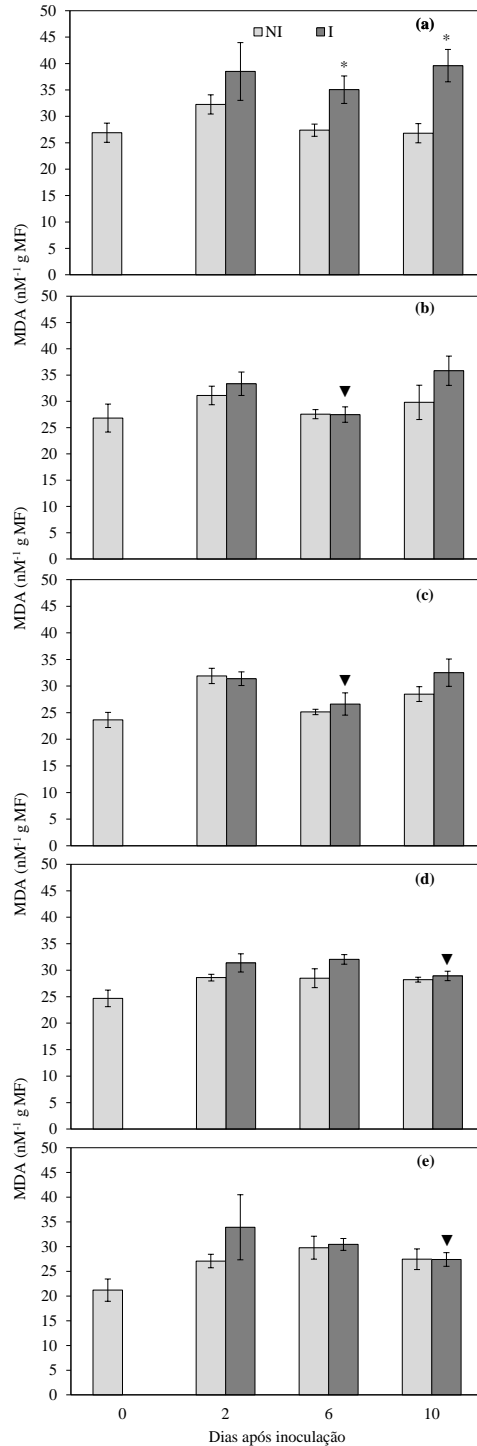


Figura 13 – Concentração do aldeído malônico (MDA) em folhas de tomateiro não inoculadas (NI) ou inoculadas (I) com *Alternaria solani* dos seguintes tratamentos: controle (a), UFV618 (b), UFV592 (c), UFV252 (d) e ácido jasmônico (e). O erro-padrão da média está representado em cada barra. Médias dos tratamentos NI e I, para cada época de avaliação, seguidas de asterisco (*), são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), pelo teste-*t*. Médias dos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e ácido jasmônico, para cada época de avaliação, seguidas do símbolo ▼, são significativamente diferentes do tratamento-controle ($P \leq 0,05$), pelo teste de *Dunnnett*, $n = 4$.

4. Discussão

O isolado UFV252 ainda não identificado é uma bactéria gram-negativa e não produz esporo de resistência. O isolado de *Streptomyces setonii* UFV618 é um actinomiceto e o isolado *Bacillus cereus* UFV592 é uma bactéria endosporogênica. UFV618 e UFV592 são bactérias gram-positivas e produzem esporos de resistência, o que pode ser uma vantagem na competição com a microbiota autóctone do solo e na formulação de produtos destinados ao controle biológico (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). Produtos comercializados à base de *Pseudomonas* spp. fluorescentes geralmente têm fracassado no biocontrole, em virtude da curta viabilidade por longo período de armazenamento, uma vez que essas bactérias não produzem estruturas de resistência (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). Entretanto, bactérias gram-positivas pela habilidade de produzirem esporos resistentes ao calor e à dessecação podem ser prontamente formulados em produtos estáveis (MADIGAN *et al.*, 2000; HAMDALI *et al.*, 2008; SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). Quando um procaríota gram-negativo é selecionado com agente de controle biológico um dos entraves é o processo de formulação; dessa maneira, bactérias que produzam estruturas de resistência, como os isolados UFV618 e UFV592, podem ser viabilizados mais rapidamente em um bioproduto comercial e também sobreviver por um período de tempo maior em condições ambientais adversas.

No presente trabalho, os antagonistas UFV592 e UFV252 e o AJ foram eficientes em reduzir a severidade da mancha-bacteriana, da murcha-de-fusário e da pinta-preta do tomateiro. O antagonista UFV618 só não foi capaz de reduzir a severidade da pinta-preta; entretanto o melhor tratamento contra a redução dos sintomas das doenças causadas pelos três patógenos estudados foi o uso do AJ. O ácido jasmônico e seus derivados têm sido considerados como moléculas sinais da resistência sistêmica induzida e efetivos contra vários patógenos (HASE *et al.*, 2008). Em um trabalho utilizando plantas de tomate deficientes na produção de AJ (*def1*) foi verificado que as plantas inoculadas com cinco de oito patógenos, tiveram a suscetibilidade aumentada contra duas bactérias (*Pseudomonas syringae* e *X. campestris*), dois fungos (*Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e um oomiceto (*Phytophthora infestans*), não sendo alterada a suscetibilidade das plantas contra os fungos *Cladosporium fulvum*, *Oidium neolycopersici* e *Septoria lycopersici*. Quando as plantas *def1* foram tratadas com o AJ o padrão de

suscetibilidade foi restabelecido, mostrando-se igual aos das plantas selvagens (THALER *et al.*, 2004). O trabalho com as plantas de tomate *defl* é corroborado pelos resultados encontrados no presente trabalho, evidenciando a importância do AJ na resistência à mancha-bacteriana, murcha-de-fusário e pinta-preta.

É possível que os antagonistas UFV618, UFV592 e UFV252 estejam induzindo a resistência sistêmica nas plantas de tomate pelas seguintes evidências: i) a separação espacial entre os antagonistas e os patógenos *Xg* e *As*, o que exclui o antagonismo direto; ii) no processo de seleção dos antagonistas, estes foram eficientes contra vários patógenos, uma das características da indução de resistência é a não especificidade de proteção; e iii) no presente trabalho os antagonistas foram capazes de aumentar a atividade de algumas PR-proteínas.

A resistência sistêmica induzida, promovida por rizobactérias, pode levar a alterações de respostas metabólicas e fisiológicas, levando a um aumento na síntese de compostos de defesa em resposta ao ataque de patógenos e, ou, aos fatores de estresses abióticos (van LOON, 2007). Plantas possuem vários genes de defesa que são ativados por apropriados estímulos ou sinais (van LOON, 2007). A indução dos mecanismos de defesa pela aplicação prévia de um indutor biológico é uma moderna técnica de proteção de plantas (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). É possível que cada rizobactéria ative diferentes mecanismos de defesa, resultando na redução diferencial dos sintomas de uma doença (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). No presente trabalho, a redução da AACPMB, AACPIMF e da AACPPP foi precedida pelo aumento diferencial nas atividades das enzimas de defesa para cada tratamento.

Os tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e o AJ reduziram os sintomas da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário. Apenas o tratamento UFV618 não foi eficiente em reduzir os sintomas da pinta-preta. A redução da AACPMB foi observada para as plantas tratadas com o antagonista UFV618, resultando em maiores atividades das enzimas QUI e LOX; maiores atividades das enzimas PPO, QUI e LOX para as plantas tratadas com os antagonistas UFV592 e UFV252 e das enzimas GLU, QUI, POX, PPO e FAL para o uso do AJ. Redução da AACPIMF foi observada com a aplicação dos antagonistas UFV618 e UFV592, o que resultou em maiores atividades das enzimas QUI e LOX, maiores atividades da QUI, POX, LOX e FAL para as plantas pulverizadas com AJ e das enzimas PFO, FAL e QUI para as plantas onde foi aplicado o antagonista UFV252. Por fim, redução da AACPPP foi alcançada com a aplicação do antagonista UFV592, resultando em maiores atividade

das enzimas QUI e FAL; maiores atividades das enzimas PFO e FAL para a aplicação do antagonista UFV252 e para as plantas pulverizadas com AJ maiores atividades da QUI, PFO, FAL e LOX.

Mesmo para as plantas não inoculadas também foi observado aumento diferencial nas atividades das enzimas de defesa para cada tratamento. Em algumas interações rizobactérias e plantas, certos genes relacionados à patogênese são super-expressos (van LOON, 2007). A maior atividade de algumas enzimas de defesa nas plantas não inoculadas dos tratamentos UFV618, UFV592 e UFV252, sugerem que mesmo rizobactérias benéficas podem ser percebidas pela planta como uma potencial ameaça, e que essas percepções podem envolver a produção de compostos de defesa, atuando similarmente a elicitores produzidos por fungos e bactérias patogênicas a plantas (van LOON, 2007).

As enzimas QUI e GLU mostram sinergismos na atividade antifúngica e são relacionadas à resistência sistêmica adquirida, rota que inclui o ácido salicílico como molécula sinal, sendo ativada por patógenos e por indutores químicos (SILVA *et al.*, 2004). Durante a infecção por patógenos, há um incremento nas atividades da GLU e QUI e os oligossacarídeos liberados a partir da atuação dessas enzimas na parede celular fúngica liberam eliciadores do patógeno que podem induzir resistência no hospedeiro (DANA *et al.*, 2006). A atividade da GLU foi maior apenas para as plantas inoculadas com *Xg* do tratamento AJ. Apesar do aumento da atividade da GLU no tratamento AJ, a função desta enzima hidrolítica na resistência de plantas à infecção por patógenos bacterianos ainda é pouco conhecida (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Plantas de tomate tratadas com acibenzolar-S-metil quatro dias antes da inoculação com *X. vesicatoria* tiveram aumento da atividade da GLU e QUI e menor severidade da mancha-bacteriana (CAVALCANTI *et al.*, 2006). QUI purificadas podem liberar oligômeros de quitina, a partir da parede celular fúngica, como também podem atuar à semelhança da lisozima, sobre paredes celulares bacterianas (Schlumbaum *et al.*, 1986; HERGET *et al.*, 1990). Para as plantas inoculadas com *Xg* e *Fol* em pelo menos uma época de coleta, os tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e AJ promoveram aumento na atividade da QUI. Entretanto, nas plantas inoculadas com *As* somente os tratamentos UFV592 e AJ tiveram a atividade da QUI maior em comparação ao controle. Parece que o aumento da atividade da QUI não é de suma importância para o isolado UFV252 promover o biocontrole da pinta-preta, pois plantas inoculadas com *As* do tratamento UFV252 não tiveram aumento da QUI

e tiveram redução na severidade. Os resultados obtidos com o antagonista UFV252 divergem dos de Latha *et al.* (2009). Uma vez que o tratamento cujas sementes de tomateiro foram microbiolizadas com uma mistura de isolados Pf1, Py15 e Bs16 tiveram aumento dos níveis da GLU e QUI nos tecidos foliares e foram mais resistentes à pinta-preta (LATHA *et al.*, 2009). Portanto, o aumento na atividade da QUI não é importante apenas para o controle de doenças fúngicas, mas também para as bacterianas. Linhagens de plantas de fumo *pschit33* superexpressando uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* foram mais resistente à mancha-bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* (DANA *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho para os tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e AJ para as plantas que foram inoculadas com *Xg*, cuja atividade da QUI contribuiu para reduzir os sintomas da mancha-bacteriana.

A POX mostra afinidade para os substratos envolvidos no processo de lignificação celular; além disso, seus produtos têm direta atividade antimicrobiana. O aumento na atividade da POX, pelo tratamento AJ, para as plantas inoculadas com *Xg* e *Fol*, pode ter contribuído para a redução da severidade da mancha-bacteriana e da murcha-de-fusário. Um isolado de *Bacillus subtilis* aplicado via solo em plantas de tomate aumentou as atividades da POX em relação ao controle e foi igualmente eficiente nas plantas pulverizadas com acibenzolar-S-metil, mas somente o isolado de *B. subtilis* foi capaz de reduzir a severidade de várias doenças da parte aérea a um nível menor do que os demais tratamentos (ARAUJO; MENEZES, 2009). Segundo os autores, apesar do indutor de resistência ter aumentado a atividade da POX à semelhança do tratamento com *B. subtilis*, acibenzolar-S-metil sozinho não foi capaz de controlar as doenças do tomateiro avaliadas no experimento. Nas condições experimentais do presente trabalho, a aplicação de AJ foi o único tratamento que aumentou a atividade da POX tanto nas plantas inoculadas com *Xg* quanto nas inoculadas com *Fol*.

A PFO é importante na fase inicial de defesa das plantas onde danos às membranas provoca a liberação de compostos fenólicos (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). Esta enzima participa na oxidação de muitos compostos fenólicos levando à produção de quinonas que são tóxicas a diversos patógenos (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996). A atividade da PFO foi sete vezes maior nas plantas pulverizadas com AJ. Possivelmente, a alta atividade da PFO, proporcionada pela pulverização do AJ nas plantas de tomateiro, tenha contribuído para uma menor severidade

da pinta-preta. Plantas de tomateiro transgênicas superexpressando o gene PFO, quando desafiadas pelo patógeno *P. syringae* pv. *tomato* mostram reduzido crescimento bacteriano (LI; STEFFENS, 2002). Entretanto, linhagens com a sequência antissenso do gene da PFO suportam o crescimento bacteriano em altos níveis (LI; STEFFENS, 2002; THIPYAPONG *et al.*, 2004). A semelhança do trabalho mostrando a importância das plantas superexpressando o gene da PFO na redução da severidade da pinta-bacteriana, a alta atividade da PFO no tratamento AJ pode ter contribuído para a redução na severidade da pinta-preta.

A primeira enzima na via biosintética do AJ é a LOX (SCHALLER; STINTZI, 2009). Produtos da ação da LOX contribuem para as reações de defesa por inibir o crescimento de patógenos, induzir fitoalexinas e na transdução de sinais (CHOI *et al.*, 1994). Nos tratamentos com os antagonistas UFV618 e UFV592, foi observada uma maior atividade da LOX antes da inoculação com *Xg* ao 0 dai. Plantas de soja microbiolizadas com PGPRs tiveram maior atividade da LOX, em todos os tratamentos cujas plantas foram inoculadas e não inoculadas com *Macrophomina phaseolina*, comparadas ao controle (sementes não microbiolizadas) (CHOUDHARY, 2011). A maior atividade da LOX nos tratamentos cujas sementes foram microbiolizadas, mas não inoculadas, é um indicativo do potencial destes isolados em promover a resistência sistêmica induzida, o que também foi observado no presente trabalho. Para as plantas inoculadas com *As*, o único tratamento que aumentou a atividade da LOX foi o AJ. Resultados semelhantes foram encontrados por Yu *et al.* (2009), em que plantas de tomateiro pulverizadas com metil-jasmonato apresentaram aumento na atividade da LOX e na resistência contra *Botrytis cinerea*.

As enzimas FAL e POX são importantes para a síntese de compostos fenólicos e da lignina em resposta à infecção por patógenos (KLESSIG; MALAMY, 1994). Apenas para as plantas pulverizadas com AJ, ocorreu uma maior atividade da FAL para as plantas inoculadas com *Xg*. Aplicações exógenas de AJ aumentou a atividade da FAL em culturas de células de *Taxus* spp. durante todo o período de avaliação enzimática (WANG; WU, 2005). No presente trabalho, durante o processo infeccioso da mancha-bacteriana a atividade da FAL foi maior do que no tratamento-controle apenas aos 5 dai. A FAL é uma enzima-chave na produção de compostos fenólicos na rota dos fenilpropanóides, o qual é responsável pela síntese de uma ampla variedade de metabólitos secundários, incluindo ligninas, salicilatos, Cumarinas, amidas do ácido hidroxinâmico, flavonóides, pigmentos, proteção contra luz

UV e antioxidantes (DIXON; PAIVA, 1995). Conforme descrito acima, produtos da atividade da FAL são muitos e, possivelmente, a maior atividade da FAL para as plantas não inoculadas comparadas com as inoculadas com *Fol*, foram outras além da produção de compostos fenólicos de defesa. Para os tratamentos UFV592, UFV252 e AJ, a atividade da FAL foi maior tanto para as plantas não inoculadas quanto para as inoculadas com *As*, em pelo menos uma época de coleta. Transcritos da PAL foram detectados em plantas de arroz não inoculadas com *Pyricularia grisea*, mas a acumulação foi muito maior para as plantas inoculadas com esse fungo (RODRIGUES *et al.*, 2005). Para as plantas inoculadas com *Xg* e *As*, em pelo menos uma época de coleta, a atividade da FAL foi maior do que para as plantas não inoculadas em todos os tratamentos, exceto para o tratamento UFV252 onde não houve diferença entre as plantas não inoculadas e inoculadas com *Xg*.

O MDA é um produto da decomposição de ácidos graxos poli-insaturados e tem sido utilizado como um marcador da peroxidação lipídica (WANG; WU, 2005). A peroxidação lipídica pode ser iniciada pelas LOX, as quais incorporam moléculas de oxigênio nas cadeias lipídicas poli-insaturadas, tendo como produto hidroperóxidos lipídicos (AXELROD *et al.*, 1981). Em todos os patossistemas estudados no presente trabalho, em pelo menos uma época de coleta a concentração de MDA foi maior no tratamento-controle inoculado em comparação aos tratamentos UFV618, UFV592, UFV252 e AJ, indicando um maior dano nas membranas no tratamento-controle, o que corrobora com os maiores valores de severidade observados.

A aplicação dos antagonistas UFV618, UFV592 e UFV252 e do indutor AJ revelou ser promissor para a indução de resistência em plantas de tomateiro inoculadas com *Xy*, *Fol* e *As*, o que foi evidenciado com o aumento das atividades de enzimas de defesa e com menores valores de severidades em comparação ao tratamento-controle. Para as plantas tratadas com os antagonistas e o AJ também foi evidenciado menores danos ao sistema de membranas, o que foi confirmado pelas menores concentrações de MDA e com os menores valores de severidade. Devem ser realizados mais testes para estudar se além da indução de resistência o controle biológico direto está ocorrendo e, também realizar estudos mais aprofundados com a proposição de formulação de bioprodutos à base dos antagonistas UFV618, UFV592 e UFV252, a serem inseridos dentro do contexto de manejo integrado de doenças do tomateiro.

5. Referências bibliográficas

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. New York: Academic Press: San Diego, 2005. 922 p.

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Plataforma de pesquisa de agrotóxicos registrados para o Brasil*. 2012. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 jun. 2012.

ALABOUVETTE, C. Biological control of fusarium wilts. Environmental biotic factors in integrated. *Plant Disease Control*, p. 61-68, 1995.

ALAMI, I.; JOUY, N.; CLERIVET, A. The lipoxygenase pathway is involved in elicitor-induced phytoalexin accumulation in plane tree (*Platanus acerifolia*) cell-suspension cultures. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 147: 515-519, 1999.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA*. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409_1.htm>. Acesso em: 12 jul. 2012

ARAÚJO, F. F. de; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa Phytopathologica*, v. 35, p. 169-172, 2009.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. *Methods in Enzymology*, v. 71, p. 441-451, 1981.

BOFF, P.; ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X. Escalas para avaliação de severidade da mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta-preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 16, p. 280-283, 1991.

BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAKMAK, L.; HOST W. J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glicine max*). *Plant Physiology*, v. 83, p. 463-468, 1991.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente: 2003. 279 p.

CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in lignin content and composition. *Plant Physiology*, v. 110, p. 3-13, 1996.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V. de; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. de C. de B.; CARVALHO, C. P. de S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, p. 1721-1730, 2006.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v. 2, p. 764-775, 1995.

CHOI, D.; BOSTOCK, R. M.; AVDIUSHKO, S.; HILDEBRAND, D. F. Lipid-derived signals that discriminate wound-responsive and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants – Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic-acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-a reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 2329-2333, 1994.

CHOUDHARY, D. K. Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnology Letters*, 33, p. 2287-2295, 2011.

COHEN, Y.; GISI, U.; NIDERMAN, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology*, 83, p. 1054-1062, 1993.

DANA, M. D.; PINTOR-TORO, J. A.; CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology*, v. 142, p. 722-730, 2006.

DE CAL, A.; PASCUAL, S.; LARENA, I.; MELGAREJO, P. Biological control of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. *Plant Pathology*, 44, v. 909-917, 1995.

DEMAIN, A. L.; LANCINI, G. Bacterial Pharmaceutical Products. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. Ed). *The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*. New York: Springer-Verlag, 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton: CRC Press: 1985. 355 p.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

EL-HENDAWY, H. H.; OSMAN, M. E.; SOROUR, N. M. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiological Research*, v. 160, p. 343-352, 2005.

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

HALFELD-VIEIRA, B. A. Procariotas residentes de filoplano como indutores de resistência à doenças em tomateiro. In.: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002. São Pedro, SP. *Anais...* São Pedro, SP: PASCHOLATI, S. F., 2002. p. 18-19.

HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M.; OUHDOUCH, Y. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, p. 2565-2575, 2008.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, v. 83, p. 313-318, 1993.

HASE, S.; TAKAHASHI, S.; TAKENAKA, S.; NAKAHO, K.; ARIE, T.; SEO, S.; OHASHI, Y.; TAKAHASHI, H. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology*, v. 57, p. 870-876, 2008.

HERGET, T.; SCHELL, J.; SCHREIER, P. H. Elicitor-Specific Induction of One Member of the Chitinase Gene Family in *Arachis-Hypogaea*. *Molecular & General Genetics*, 224: 469-476, 1990.

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

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

KAR, M.; MIASHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, v. 57, p. 315-319, 1976.

KEEN, N. T.; YOSHIKAWA, M. Beta-1,3-Endoglucanase from Soybean Releases Elicitor Active Carbohydrates from Fungus Cell-Walls. *Plant Physiology*, 71, p. 460-465, 1983.

KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The Salicylic-Acid Signal in Plants. *Plant Molecular Biology*, v. 26, p. 1439-1458, 1994.

KUC', J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *Europeam Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. Ceres: São Paulo, 1997. p. 690-719.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAPPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 50: 85-93, 2009.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, v. 47, p. 273-279, 1972.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, v. 215, p. 239-247, 2002.

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

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUIJN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, v. 85, p. 528-536, 1995.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.; DE SOUZA, J.; POMELLA, A. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34, p. 122-132, 2006.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.; POMELLA, A.; DE SOUZA, J. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biological control: Theory and Applications in Pest Management*, v. 47, p. 309-314, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock: Biology of microorganisms*. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 991 p.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v. 26, p. 195-217, 1923.

MELLO, S. C. M.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 447-448, 1997.

NAFIE E.; HATHOUT, T.; AL MOKADEM, A. S. Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, p. 161-174, 2011.

PATIL, H. J.; SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D. P.; CHAUDHARI, B. L.; ARORA, D. K. Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop Protection*, v. 30, p. 1269-1273, 2011.

PATTERSON, J. M.; NOKES, S. E. Incorporation of chlorothalonil persistence on processing tomato into TOM-CAST. *Agricultural Systems*, v. 64, p. 171-187, 2000.

PIETERSE, C. M. J.; van WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; van PELT, J. A.; van LOON, L. C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, v. 8, p. 1225-1237, 1996.

PRAMER, D.; SCHMIDT, E. L. *Experimental soil microbiology*. Minnesota: Burgess, 1964. 107 p.

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 426-428, 2005.

RIDE, J. P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiology Plant Pathology*, 5, p. 125-134, 1975.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, v. 134, p. 169-176, 1988.

RODRIGUES, F. A.; JURICK, W. M.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; ROLLINS, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 66, p. 144-159, 2005.

RODRIGUES, T. T. M. S.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E. S. G. In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*, v. 35, p. 203-212, 2010.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias fitopatogênicas*. Viçosa: Editora UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. S.; FILHO, L.; VIEIRA, J. R.; SILVA, H. S. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; CARVALHO, M. G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, v. 153, p. 120-123, 2005.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Fems Microbiology Letters*, v. 278, p. 1-9, 2008.

SCHALLER, A.; STINTZI, A. Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1532-1538, 2009.

SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, v. 324, p. 365-367, 1986.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of show-mildwing in knox wheat. *Phytopathology*, v. 67, p. 1051-1055, 1997.

SHANMUGAM, V.; KANOUIA, N. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control*, 57: 85-93, 2011.

SHERIF, S.; PALIYATH, G.; JAYASANKAR, S. Molecular characterization of peach PR genes and their induction kinetics in response to bacterial infection and signaling molecules. *Plant Cell Reports*, v. 31, p. 697-711, 2012.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. D.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. D.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, v. 29, p. 288-295, 2004a.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J. L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology*, v. 152, p. 371-375, 2004b.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; CARRER, R.; PEREIRA, J. L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology*, v. 152, p. 371-375, 2004c.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, v. 29, p. 288–295, 2004d.

THALER, J. S.; OWEN, B.; HIGGINS, V. J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*, v. 135, p. 530-538, 2004.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, v. 220, p. 105-117, 2004.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M.; CORREIA, L. G. Avaliação fitossanitária da cultura do tomateiro em regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, p. 211, 1992.

van LOON, L. C. Plant responses of plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, v. 119, p. 243-254, 2007.

van LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 453-483, 1998.

van WEES, S. C. M.; LUIJENDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; van LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, v. 41, p. 537-549, 1999.

WANG, J. W.; WU, J. Y. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. *Plant and Cell Physiology*, v. 46, p. 923-930, 2005.

YU, M. M.; SHEN, L.; FAN, B.; ZHAO, D. Y.; ZHENG, Y.; SHENG, J. P. The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Postharvest Biology and Technology*, v. 54, p. 153-158, 2009.

ZAMBOLIM, L. *Manejo integrado-fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto*. Viçosa: Editora UFV, 2001. 722 p.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, v. 40, p. 779-784, 1965.