

BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA

**BACTÉRIAS RESIDENTES DO FILOPLANO DE TOMATEIRO COMO  
AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE ENFERMIDADES DA PARTE  
AÉREA DA CULTURA**

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  
2002

Aos meus pais Bernardo e Maria Regina

a minha irmã Adriana, meus sobrinhos Miguel e Camilo

a Kátia pelo companheirismo durante todo este tempo,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida durante boa parte do curso e pelo apoio financeiro dado ao projeto

À Embrapa pela oportunidade em continuar o curso de doutorado.

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro pela orientação, amizade, confiança e pelo incentivo constante.

Aos conselheiros Prof. Eduardo S. G. Mizubuti e Prof.<sup>a</sup> Maria Cristina Baracat Pereira.

Ao Prof. José Rogério de Oliveira pela amizade, atenção, disponibilidade e sugestões.

A todos os mestres que participaram da minha formação ao longo desta longa jornada.

Aos funcionários do DFP, em especial à Sueli.

A todos os colegas do laboratório pela convivência agradável.

Aos colegas de curso.

Aos amigos.

**AGRADEÇO**

## **BIOGRAFIA**

BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA, filho de Bernardo Halfeld Vieira e Maria Regina de Almeida Halfeld Vieira, nasceu em Curitiba-PR, em 8 de março de 1972.

Em 1996, graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

Em 1999, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras, MG.

No mesmo ano iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa.

Desde outubro de 2001 é pesquisador da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

## ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	4
ARTIGO 1:	
COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE TOMATEIRO VISANDO POPULAÇÕES ESPECÍFICAS E IMPLICAÇÕES NA SUA EFICIÊNCIA COMO AGENTES DE BIOCONTROLE .....	7
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO .....	8
MATERIAL E MÉTODOS .....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
ARTIGO 2:	
ANTIBIOSE COMO MECANISMO DE BIOCONTROLE POR BACTÉRIAS DE FILOPLANO DE TOMATEIRO E SUA INADEQUAÇÃO COMO CRITÉRIO DE SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	23

INTRODUÇÃO .....	24
MATERIAL E MÉTODOS .....	25
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
ARTIGO 3:	
CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO BACTERIANOS OBTIDOS DO FILOPLANO DE TOMATEIRO.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO .....	40
MATERIAL E MÉTODOS .....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ARTIGO 4:	
SENSIBILIDADE DE AGENTES BACTERIANOS DE CONTROLE BIOLÓGICO A PRODUTOS ANTIMICROBIANOS E FUNGICIDAS AGRÍCOLAS UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATEIRO .....	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	55
INTRODUÇÃO .....	56
MATERIAL E MÉTODOS .....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ARTIGO 5:	
ATIVIDADE DE ENZIMAS INDICADORAS DO ESTADO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E SEU POSSÍVEL ENVOLVIMENTO NO CONTROLE DE PATÓGENOS POR UMA BACTÉRIA DE FILOPLANO DO TOMATEIRO .....	68
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	68
INTRODUÇÃO .....	69
MATERIAL E MÉTODOS .....	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

ARTIGO 6:

EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE TOMATEIRO NO CONTROLE DE DOENÇAS DA PARTE AÉREA DA CULTURA EM CONDIÇÕES DE CAMPO .....	85
RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	85
INTRODUÇÃO .....	86
MATERIAL E MÉTODOS .....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
CONCLUSÕES GERAIS .....	97

## RESUMO

VIEIRA, Bernardo de Almeida Halfeld, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2002. **Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Maria Cristina Bacarat Pereira.

A busca de alimentos produzidos sob um sistema de manejo menos agressivo ao meio ambiente vem sendo adotado por um número cada vez maior de produtores. Entretanto, apesar de existirem diversos benefícios na redução ou até eliminação do uso de defensivos, a grande diversidade de doenças em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), capazes de limitar a produção, torna necessária a busca por alternativas viáveis, eficientes e tecnicamente comprovadas. Dentre os organismos mais estudados, bactérias têm sido relatadas como agentes de biocontrole capazes de atuar por meio de mecanismos como antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência. O presente trabalho teve como objetivos selecionar bactérias do filoplano do tomateiro, baseado em uma estratégia de seleção *in vivo*, verificando se há um método de isolamento que permita obter antagonistas eficientes no controle da pinta-preta, causada por *Alternaria solani*, requeima por *Phytophthora infestans*, mancha-bacteriana pequena por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e mancha-bacteriana por *Xanthomonas vesicatoria*. Objetivou ainda estudar a possibilidade dos mecanismos de antibiose e indução de resistência serem responsáveis pelo controle destas doenças e se testes de antibiose *in vitro* são adequados como critério de seleção. Caracterizar aspectos

biológicos dos antagonistas que podem otimizar sua aplicação como agente de biocontrole. Determinar a quais produtos antimicrobianos os isolados são insensíveis, visando fornecer subsídios para o desenvolvimento de meios semi-seletivos e estudos de dinâmica populacional. Verificar sua compatibilidade com antibióticos e fungicidas registrados para o controle de enfermidades do tomateiro, a fim de inseri-lo no sistema de manejo integrado e estudar a eficiência de antagonistas selecionados em condições de campo. Os resultados demonstram que, em folíolos mais jovens, os métodos de isolamento que visam obter bactérias da população total e da superfície do filoplano, foram os que permitiram obter a maioria dos antagonistas. O único obtido de folíolos mais velhos foi proveniente da população capaz de habitar sítios protegidos do filoplano e/ou resistir a fatores de estresse. Não se observou relação entre características biológicas dos antagonistas e dos patógenos testados. Nos testes de antibiose com os antagonistas selecionados, o isolado UFV-STB 6 foi capaz de produzir compostos voláteis e inibir a germinação de cistos de *Phytophthora infestans*, o que possivelmente deve estar envolvido no controle da requeima. O isolado UFV-IEA 6 produziu quitinase, havendo uma tendência em reduzir a taxa de crescimento de *Alternaria solani* por compostos voláteis. Ficou demonstrado que os testes de antibiose *in vitro* são inadequados como critério para seleção de agentes de biocontrole do filoplano de tomateiro. A caracterização dos melhores antagonistas demonstrou que três são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, e uma Gram-negativa, pleiomórfica. Dentre as Gram-positivas todas são anaeróbias facultativas e uma forma endósporos. Nenhum antagonista foi capaz de causar reação de hipersensibilidade (HR) em fumo e produzir pigmento fluorescente *in vitro*. Os períodos de geração calculados a partir das curvas de crescimento revelaram que três isolados são capazes de se multiplicar rapidamente em meio de cultura, o que é uma característica desejável. Os resultados obtidos a partir dos antibiogramas, mostraram que existem antibióticos que podem ser utilizados para elaboração de meios semi-seletivos, adequados a cada antagonista e os testes de compatibilidade com antibióticos e fungicidas utilizados na cultura do tomateiro revelaram que os antagonistas podem ser expostos aos fungicidas benomyl, enxofre, dimetomorph e tiofanato-metílico. Verificou-se também a inadequação de se utilizarem compostos antimicrobianos em meio de cultura para isolamento de agentes bacterianos de controle biológico, uma vez que os antagonistas selecionados foram sensíveis à maioria dos produtos testados. Os testes com as enzimas indicadoras do estado de indução de resistência,  $\beta$ -1,3-glucanases, Fenilalanina amônia-liase (PAL),

Peroxidases (PO), Polifenoloxidasas (PPO) e Lipoxigenases (LOX), indicaram que o isolado UFV-IEA 6 foi capaz de promover aumento significativo na atividade das PO, evidenciando a possibilidade do antagonista agir como indutor de resistência. Esse parece ser o primeiro caso que se tem conhecimento de uma bactéria não fitopatogênica do filoplano induzindo resistência na mesma cultura de onde foi obtida. Os testes com os dois antagonistas em condições de campo demonstraram que UFV-STB 6 foi o mais eficiente em reduzir a severidade da requeima no terços médio e superior das plantas, enquanto UFV-IEA 6, somente no terço superior. Houve tendência na redução do progresso da septoriose por UFV-STB 6 e capacidade em diminuir o número de frutos com sintomas de requeima. Os resultados demonstram o potencial de uso dos agentes de biocontrole selecionados para as doenças da parte aérea de tomateiro estudadas.

## ABSTRACT

VIEIRA, Bernardo de Almeida Halfeld, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2002. **Tomato phylloplane resident bacteria as biological control agents of aerial diseases.** Advisor: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee Members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Maria Cristina Bacarat Pereira.

Farmers are increasingly adapting environmentally less aggressive management systems for food production and there are many benefits in reducing or even eliminating pesticide use. Due to a large number of production limiting diseases on tomato (*Lycopersicon esculentum*), it is desirable to find technically viable and proven alternatives for their control. Among the microorganisms, bacteria have been reported as biocontrol agents capable of acting through antibiosis, parasitism, competition and induced resistance. The present study aimed at selecting the tomato phylloplane bacteria, based on *in vivo* isolation strategy, and to determine if this method permits obtaining efficient antagonists to control *Alternaria solani* leaf spot, *Phytophthora infestans* blight, small bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, and bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas vesicatoria*. The study also aimed at determining mechanisms of action, such as antibiosis and induced resistance, involved in disease control, and to determine if the antibiosis tests are sufficient selection criteria. The study also included biological characterization of the antagonists that may optimize their use. To help develop selective or semi-selective media for population dynamic studies, insensitivity of selected isolates to some antimicrobial compounds was also determined. The compatibility of select antagonists with antibiotics and fungicides

registered for control of tomato diseases was elucidated so that the antagonist can be inserted in the integrated management. Field studies were done to determine the efficiency of select antagonists. The isolation method that obtain total bacterial population from the phylloplane of the young leaflets permitted obtaining maximum number of antagonists. The only one isolate obtained from the older leaflets originated from the population capable of inhabiting protected sites of phylloplane and/or that resist stress factors. There was no relation between biological characteristics of the antagonists and of the pathogen tested. In the antibiosis testes, the isolate UFV-STB 6 produced volatile compounds that inhibited germination of *P. infestance* cyst and may be involved in the control of blight. The isolate UFV-IEA 6 produced chitinase and showed a tendency to reduce *A. solani* growth by the volatile compounds. *In vitro* antibiosis testes were inadequate criteria to select biocontrol agents from tomato phylloplane. The characterization of promising antagonists showed that three were Gram positive bacilli and one was gram negative pleiomorphic bacteria. Among the Gram positives all were facultative anaerobes and the one formed endospores. None of the antagonists caused hypersensitive reaction (HR) in tobacco, and did not produce fluorescent pigment *in vitro*. The generation period calculated from the growth curve revealed that three isolates are capable of multiplying rapidly in the culture media, which is a desirable characteristic. The antibiograms showed that there are antibiotics that can be used for elaboration of semi-selective media for each of antagonists and the compatibility testes with antibiotics and fungicides used on tomato crop revealed that the antagonists can be exposed to fungicides such as benomyl, sulfur, dimethomorph and thiophante-methyl. Many antimicrobial compounds were inhibitory to the selecte antagonists in culture media used for isolation of bacterial biocontrol agents, therefore were inadequate for use in selective media. The analysis of enzymes involved in induced resistance, like -1,3-gluconase, phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (PO), polyphenol oxidase (PPO) and lipoxigenase (LOX), showed that the isolate UFV-IEA 6 was capable of increasing PO activity, showing the possibility of being a resistance inducer . This appears to be the first case of a non-pathogenic phylloplane bacterium inducing resistance in a plant of origin. The field testes with two antagonists, UFV-STB 6 was more efficient in reducing the blight severity in the middle and upper third of the plant, while UFV-IEA 6 only in the upper third. The latter isolate also showed a tendency for reducing the *Septoria* leaf spot progress and the number of

fruits with the blight symptoms. The results showed these isolates have the potential of use to control tomato diseases of aerial parts.

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma cultura olerácea amplamente cultivada no mundo (Filgueira, 2000) sendo o Brasil atualmente o sétimo produtor mundial (FAO, 2002). A cultivar Santa Clara abrange mais de 70% do mercado para consumo *in natura*, com frutos do tipo 'Santa Cruz' (Peixoto *et al.*, 2001). Dentre as hortaliças processadas é a mais importante (Vilela & Macedo, 2000).

Atualmente, a busca de alimentos produzidos sob um sistema de manejo capaz de agredir menos o ambiente vem aumentando consideravelmente entre os produtores, visando causar menos impactos ecológicos que sistemas agrícolas convencionais (Browne *et al.*, 2000; Rigby *et al.*, 2001; Mäder *et al.*, 2002). Esta tendência se reflete no surgimento de nichos de mercado dispostos a oferecer maior remuneração por produtos orgânicos, que podem chegar a preços 30% superiores que os pagos por produtos não orgânicos, tornando viável o investimento neste sistema de produção (Junqueira & Luengo, 2000). Estima-se que, dentre os agricultores brasileiros que produzem especificamente para este mercado, cerca de 7,77% cultivam hortaliças, em uma área de 2.989 ha, sendo o tomateiro uma das principais culturas (Ormond *et al.*, 2002).

Entretanto, apesar de existirem diversos benefícios na redução ou até eliminação do uso de defensivos, o grande número de doenças do tomateiro, capazes de limitar a produção (Lopes & Santos, 1994; Kurozawa & Pavan, 1997), torna necessária a busca por alternativas viáveis, eficientes e tecnicamente comprovadas (Lazarovitz, 2001). O controle biológico de doenças de plantas vem sendo cada vez mais explorado, com um

aumento crescente das pesquisas nesta área a partir dos últimos 20 anos, gerando atualmente cerca de 40 produtos comerciais nos EUA (Paulitz & Bélanger, 2001; APS Biological Control Committee, 2002).

Dentre os organismos mais estudados, bactérias têm sido relatadas como agentes de biocontrole capazes de atuar através de diversos mecanismos como antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (Whipps, 2001; Gerhardson, 2002). A antibiose é um dos mecanismos mais explorados (Strobel *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001; Stockwell *et al.*, 2002) e consiste na produção de metabólitos capazes de suprimir o desenvolvimento de outro organismo. A produção de enzimas capazes de degradar componentes, como os que constituem a parede celular, caracteriza o mecanismo de parasitismo (Kong *et al.*, 1997; Guetsky *et al.*, 2002), uma vez que se admite que é um meio da bactéria ter acesso a nutrientes. Porém, muitas vezes, a produção de antibióticos e enzimas ocorre simultaneamente, dificultando a elucidação do mecanismo de controle envolvido (Whipps, 2001). Na competição, a produção de sideróforos é a mais estudada, principalmente envolvendo espécies de *Pseudomonas* que utilizam estes compostos como meio de competir por ferro (Laine *et al.*, 1996; Whipps, 2001). A indução de resistência é um dos mecanismos de biocontrole que mais evoluiu nos últimos anos (Whipps, 2001), principalmente utilizando rizobactérias como indutores (Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998).

No filoplano, bactérias são os organismos mais abundantes, com uma população estimada em  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> de superfície foliar. Entretanto, pouco se sabe em relação a diversos aspectos de bactérias não patogênicas que colonizam este local, que aparentemente exercem importante papel na supressão de organismos deletérios (Lindow & Leveau, 2002). Explorar suas potencialidades e investigar como podem ser utilizadas como agentes de controle biológico de patógenos de parte aérea, pode trazer grandes contribuições no manejo de doenças.

O presente trabalho teve como objetivos selecionar bactérias do filoplano do tomateiro, baseado em uma estratégia de seleção *in vivo*, verificando se há um método de isolamento que permita obter antagonistas eficientes no controle de importantes doenças do tomateiro causadas por *Alternaria solani* Sorauer, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 e *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995. Estudar a possibilidade dos mecanismos de antibiose e indução de resistência serem responsáveis pelo controle destas doenças e se testes de antibiose *in*

*vitro* são adequados como critério de seleção. Caracterizar aspectos biológicos dos antagonistas que podem otimizar sua aplicação como agente de biocontrole. Determinar a sensibilidade dos antagonistas selecionados a compostos antimicrobianos, visando fornecer subsídios para o desenvolvimento de meios semi-seletivos e estudos de dinâmica populacional. Verificar sua compatibilidade com antibióticos e fungicidas registrados para o controle de enfermidades do tomateiro, a fim de inseri-lo no sistema de manejo integrado e estudar a eficiência de antagonistas selecionados em condições de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APS BIOLOGICAL CONTROL COMMITTEE. **Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens**. In: <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/> 2002.
- BROWNE, A.W.; HARRIS, P.J.C.; HOFNY-COLLINS, A.H.; PASIECZNIK, N.; WALLACE, R.R. Organic production and ethical trade: definition, practice and links. **Food Policy**. v. 25, n. 1, p. 69–89, 2000.
- FAO                **FAOSTAT**                **Database**                **Collections**.                In:  
<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture/> 2002.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura-agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.
- GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**. v.20 n. 8, p. 338-343, 2002.
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease supression. **Phytopathology**. v. 92, n. 9, p. 976-985, 2002.
- JIANG, Y.M.; ZHU, X.R.; LI, Y.B. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 34, n. 7, p. 430-436, 2001.
- JUNQUEIRA, A.H.; LUENGO, R.F.A. Mercados diferenciados de hortaliças. **Horticultura Brasileira**. v. 18, n. 2, p. 95-99, 2000.
- KONG, G.A.; KOCHMAN, J.K.; BROWN, J.F. Phylloplane bacteria antagonistic to the sunflower pathogen *Alternaria helianthi*. **Australasian Plant Pathology**. v. 26, n. 2, p. 85-97, 1997.

- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, v. 2, p. 690-719, 1997.
- LAINE, M.H.; KARWOSKI, M.T.; RAASKA, L.B.; MATTILA-SANDHOLM, T.M. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* spp. against food poisoning bacteria and moulds. **Letters in Applied Microbiology**. v. 22, p. 214-218, 1996.
- LAZAROVITZ, G. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 23, n. 1, p. 1-7, 2001.
- LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 3, p. 238–243, 2002.
- LOPES, C.A.; SANTOS, R.M. **Doenças do Tomateiro**. Brasília: Embrapa, 1994. 67 p.
- MÄDER, P.; FLIEßACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**. v. 296, n. 5573, p. 1694-1697, 2002.
- ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FAVERET FILHO, P.; ROCHA, L.T.M. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. **BNDES Setorial**. n. 15, p. 3-34, 2002.
- PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems **Annual Review of Phytopathology**. v. 39, p. 103–33, 2001.
- PEIXOTO, J.R.; MATHIAS FILHO, L.; SILVA, C.M.; OLIVEIRA, C.M.; CECILIO FILHO, A.B. Produção de genótipos de tomateiro tipo ‘Salada’ no período de inverno, em Araguari. **Horticultura Brasileira**. v. 19, n. 2, p. 148-150, 2001.
- RIGBY, D.; WOODHOUSE, P.; YOUNG, T.; BURTON, M. Constructing a farm level indicator of sustainable agricultural practice. **Ecological Economics**. v. 39, n. 3, p.463-478, 2001.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v. 35, p. 235-270, 1997.
- STOCKWELL, V.O.; JOHNSON, K.B.; SUGAR, D.; LOPER, J.E. Antibiosis Contributes to Biological Control of Fire Blight by *Pantoea agglomerans* Strain Eh252 in Orchards. **Phytopathology**. v. 92, n. 11, p. 1202-1209, 2002.
- STROBEL, G.; LI, J.Y.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H.; HARPER, J.; HESS, W.M. Oocidin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. **Microbiology**. v. 145, n. 12, p. 3557-3564, 1999.

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.

VILELA, N.J.; MACEDO, M.M.C. Fluxo de poder no agronegócio: o caso das hortaliças. **Horticultura Brasileira**. v. 18, n. 2, p. 88-94, 2000.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal of Experimental Botany**. v. 52, special issue, p. 487-511, 2001.

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE  
BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE TOMATEIRO VISANDO POPULAÇÕES  
ESPECÍFICAS E IMPLICAÇÕES NA SUA EFICIÊNCIA  
COMO AGENTES DE BIOCONTROLE**

**RESUMO**

Em um processo de seleção de bactérias do filoplano de tomateiro com potencial para o controle de doenças de parte aérea da cultura, diferentes métodos de isolamento foram utilizados visando obter isolados da população total, da população da superfície foliar e isolados que habitam locais protegidos do filoplano e/ou que toleram fatores de estresse. Foi testada a capacidade de 300 isolados em controlar *in vivo*, as doenças causadas por *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Phytophthora infestans*. Os testes foram repetidos para cada um dos antagonistas selecionados, estudando-se também a capacidade de controlar a mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria*. Os resultados demonstraram haver predomínio de antagonistas provenientes de folíolos do terço superior da planta de população total ou da superfície. Entretanto, o único antagonista selecionado, isolado de folíolos do terço inferior, foi obtido de locais protegidos do filoplano e/ou capaz de tolerar fatores de estresse.

**ABSTRACT**

In a process of selecting tomato phylloplane bacteria with the potential of controlling the aerial diseases of this crop, different isolation methods were used to obtain the isolates from total leaf surface and also from protected sites of the phylloplane and/or those tolerant to stress factors. Three hundred isolates were tested *in vivo* for their ability to control the diseases caused by *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Phytophthora infestans*. The tests were repeated for each of the selected antagonist, to also determine their capacity to control the bacterial wilt, caused by *Xanthomonas vesicatoria*. The results demonstrated predominance of antagonists in

the total population originating from the surface of the leaflets harvested from the upper third of the plants, while only one selected antagonistic isolate obtained from the lower third was recovered from the protected sites of the phylloplane and/or was stress tolerant.

## INTRODUÇÃO

Dentre os diversos agentes bióticos que podem ser utilizados em controle biológico, as bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas às rizobactérias (Lindow & Leveau, 2002) e esta diferença se deve, em grande parte, às características do habitat onde cada um se encontra. A filosfera (Last, 1955; Ruinen, 1956) é um ambiente complexo, que sofre variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis (Andrews & Hirano, 1991; Wilson *et al.*, 1999), o que dificulta o estabelecimento de populações no filoplano. Estes fatores fazem com que, muitas vezes, agentes de biocontrole promissores sejam ineficientes, por serem incapazes de sobreviver ou manter suas populações em alta densidade, o que os impede de exercer suas funções no controle de doenças (Leben, 1985).

Desta forma, obter antagonistas com maior capacidade de sobrevivência, pode ser um fator que determine sua efetividade em condições de campo. As bactérias do filoplano utilizam basicamente dois tipos de estratégias para sobreviverem em ambientes de estresse, de tolerância e de escape. A primeira requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta, baixa umidade, além de outros, enquanto a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais (Andrews & Hirano, 1991; Beattie & Lindow, 1995; Beattie & Lindow, 1999; Wilson *et al.*, 1999). Adotar metodologias que explorem essas propriedades pode ser um modo de otimizar a obtenção de bons agentes de biocontrole.

Além da questão da sobrevivência, um outro fator que pode ser essencial para que um antagonista seja eficaz é o seu estabelecimento no mesmo local que o patógeno, desenvolvendo-se nas mesmas condições ambientais ideais para a ocorrência da doença. Assim, um processo de seleção de antagonistas visando o controle da pinta-preta,

causada por *Alternaria solani* Sorauer, poderia ser mais eficiente utilizando antagonistas que habitem folíolos mais velhos, já que nestes locais o patógeno se desenvolve melhor e apresenta período de incubação mais curto do que em folíolos jovens (Rotem, 1994). Da mesma forma, pode-se fazer uma analogia à capacidade do antagonista se desenvolver rapidamente em faixas de temperatura ideais para cada patógeno desafiante. *A. solani* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978, por exemplo, têm como temperatura ótima de desenvolvimento 25°C (Rotem, 1994; Preston, 2000); já *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary se desenvolve muito bem em uma faixa de temperatura próxima a 18°C (Erwin & Ribeiro, 1996).

Este trabalho teve como objetivo obter antagonistas com capacidade de controle das doenças causadas por *A. solani*, *P. infestans* e *P. s. pv. tomato*, em condições de casa-de-vegetação, a partir de trezentos isolados bacterianos obtidos do filoplano de tomateiro, testando-se também sua eficiência contra *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995.

Por meio de metodologias distintas, investigou-se a possibilidade de haver relação entre os critérios de isolamento de cada antagonista, com os locais habitados naturalmente por eles e sua capacidade de sobrevivência no filoplano, além de se associar características específicas da biologia de cada antagonista e dos patógenos desafiantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta dos folíolos

As amostras foram coletadas em diferentes épocas e locais, de plantas de tomateiro não submetidas à pulverização com produtos químicos, em plantios caseiros na cidade de Viçosa-MG. Retiraram-se folíolos ao acaso no terço superior (S) e inferior (I) da planta. Os folíolos foram acondicionados em sacos de papel e foram identificados de acordo com o local da planta da qual foram retirados.

## **Isolamento dos potenciais candidatos a antagonistas**

Isolados dos candidatos a antagonistas foram obtidos de três formas distintas. Visando obter amostras da população total de bactérias do filoplano (T), dois folíolos foram depositados em Erlenmeyer de 150 mL de capacidade, contendo 50 mL de solução salina (0,85% NaCl) estéril com 0,3% de Tween 80 (Romeiro, 2001) e submetidos a ultra-som a 60 Hz por 20 min. Para isolamento de bactérias da população da superfície foliar (L), foram pipetados 3 mL de solução salina estéril com 0,3% de Tween 80 com pipeta automática, deixando-se escorrer esta alíquota sobre cada folíolo obtendo-se um extrato pela lavagem de dois folíolos por amostra. Já para obtenção de isolados que habitam locais protegidos do filoplano e/ou que toleram fatores de estresse (E), dois folíolos permaneceram por 30 s em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% sendo em seguida lavados rapidamente em água estéril (adaptado de Schneider & Grogan, 1977) e submetidos a ultra-som a 60 Hz por 20 min, nas mesmas condições para obtenção de amostras da população total.

Para cada extrato foi feita uma diluição seriada, em fator de diluição variando até 1:5<sup>3</sup>, sendo depositados 100 µL das amostras obtidas em cada diluição, em duas placas de Petri contendo meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) espalhando-se com alça de Drigalski sobre a superfície para o semeio (Romeiro, 2001). Uma das placas semeadas com a mesma amostra foi levada à incubadora a 25°C (A) e outra a 18°C (B).

As culturas puras foram obtidas de placas cujo fator de diluição permitiu o crescimento de colônias isoladas. Estas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970), coletando-se preferencialmente colônias morfológicamente distintas (Berg *et al.*, 2002). Um total de trezentos isolados bacterianos foi obtido nesta etapa.

## **Seleção massal**

Para seleção massal dos melhores antagonistas, foram utilizadas plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Santa Cruz 'Kada' com cinco folhas desenvolvidas, contidas em vasos independentes, com capacidade para 500 mL. Cada grupo de seis plantas foi pulverizado com uma suspensão ajustada em absorbância a 540 nm ( $A_{540}$ ) igual a 0,3 de um dos candidatos a antagonistas a ser testado, utilizando-

se como tratamentos controle para *A. solani* e *P. infestans* três plantas pulverizadas com clorotalonil (1,5 g i.a. L<sup>-1</sup>) e para *P. s. pv. tomato* três plantas com oxiclureto de cobre (1,7 g i.a. L<sup>-1</sup>). A testemunha consistiu de seis plantas pulverizadas com água.

Após quatro dias em casa-de-vegetação, folíolos das plantas pulverizadas com as bactérias em teste e com clorotalonil foram retirados e depositados em três caixas gerbox contendo papel toalha umedecido, em uma quantidade suficiente para cobrir toda a superfície interna das caixas. Três plantas foram pulverizadas com uma suspensão de conídios de *A. solani* (2,5 x 10<sup>3</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) e outras três com suspensão de células de *P. s. pv. tomato* (A<sub>540</sub>= 0,15), levando-se para câmara úmida por 24 h a 25°C, constituindo-se cada planta uma repetição. Os folíolos depositados em gerbox foram borrifados com 2,5 x 10<sup>3</sup> cistos mL<sup>-1</sup> de *P. infestans*. Cinco lâminas de microscopia foram distribuídas entre as caixas para se determinar, por microscopia, o número de cistos por área pulverizada. O material foi mantido em câmara de crescimento a 18°C com fotoperíodo de 12 h.

Ao serem observados os primeiros sintomas, quantificou-se o número de lesões/folíolo para *A. solani* e *P. s. pv. tomato*. Para *P. infestans*, foi determinada a frequência de infecção calculando-se a porcentagem de lesões nos folíolos contidos na área interna das gerbox em relação ao número de cistos depositados, determinado no momento da inoculação. A severidade da doença três dias após o aparecimento dos sintomas também foi quantificada, uma vez que, em alguns casos, houve esporulação do patógeno sem serem observadas manchas nos folíolos. A avaliação foi feita comparando-se a área foliar sadia dos tratamentos com cada antagonista e os folíolos tratados com clorotalonil.

Testou-se um total de trezentos isolados bacterianos, para cada um dos patógenos, em seis ciclos de seleção, utilizando-se cinquenta isolados por ciclo.

O critério de seleção adotado preconizou que os antagonistas que proporcionavam menor severidade de doença, com menor valor de desvio padrão, para pelo menos dois patógenos, fossem selecionados em cada etapa.

Dos trezentos isolados bacterianos testados para cada patógeno, um total de dez antagonistas foi preliminarmente selecionado.

## **Determinação dos melhores antagonistas selecionados**

Para escolha dos antagonistas mais promissores dentre os dez provenientes da seleção massal, o mesmo procedimento foi adotado, testando-se também *X. vesicatoria* como patógeno desafiante, da mesma forma que os ensaios para *P. s. pv. tomato*. Entretanto, foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi representada por duas plantas de tomate cv. Santa Clara, com cinco folhas desenvolvidas, cultivadas em vasos independentes.

Nesta etapa foram selecionados os quatro antagonistas com eficiência contra o maior número de patógenos desafiantes, por meio dos mesmos critérios de avaliação utilizados na etapa de seleção massal.

## **Confirmação da efetividade dos antagonistas**

Em etapa posterior de confirmação da efetividade dos quatro melhores antagonistas, foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, utilizando-se a metodologia adotada nos ensaios anteriores, porém utilizando plantas de tomate cv. Santa Cruz 'Kada'. Os patógenos desafiantes utilizados nesta etapa foram *A. solani*, *P. s. pv. tomato* e *X. vesicatoria*.

## **Análise de dados**

A análise estatística dos ensaios foi realizada por meio do programa SAS, versão 8.00, utilizando o Proc GLM e teste de Tukey a 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os procedimentos para isolamento permitiram obter diferentes números de unidades formadoras de colônias. Nos métodos T e L, somente nas culturas provenientes do extrato submetido a diluição em fator 1:5<sup>3</sup> foram observadas colônias isoladas enquanto que, no método E observaram-se colônias apenas no extrato não diluído, em número bastante reduzido. Estas observações indicam que a probabilidade de se obter bactérias provenientes de populações que habitam sítios protegidos ou que

toleram fatores de estresse, pelos métodos T e L é muito pequena, já que sua representatividade na população total foi menor. Verificou-se também menor número de colônias de culturas das mesmas amostras incubadas a 18°C, que as incubadas a 25°C. Houve também um maior atraso para o seu surgimento, como esperado.

Das trezentas bactérias testadas para cada patógeno desafiante em seis ciclos de seleção massal, um total de dez antagonistas foi selecionado (Tabela 1). Não foi observada tendência relacionando o método de isolamento utilizado com características biológicas específicas dos patógenos desafiantes. Entretanto, os resultados indicam haver predomínio de antagonistas obtidos a partir de folíolos do terço superior da planta, de população total ou da superfície, com exceção do antagonista UFV-IEA 6, obtido de folíolos do terço inferior após desinfestação dos folíolos.

É possível que organismos isolados por este procedimento se aproveitem de vantagens como tolerar as adversidades ambientais ou colonizar os sítios protegidos, uma vez que nestes locais ocorre grande competição entre microrganismos, que procuram um ambiente com maior estabilidade (Schneider & Grogan, 1977; Leben, 1988). Além disso, dois fatores oferecem vantagens na colonização destes sítios: uma maior capacidade de sobrevivência por serem locais menos sujeitos a estresses ambientais (Beattie & Lindow, 1995; Beattie & Lindow, 1999; Wilson *et al.*, 1999) e o acesso a nutrientes pouco disponíveis (Andrews & Hirano, 1991). Mercier & Lindow (2000) demonstraram que, embora a disponibilidade de fontes de carbono em folíolos de tomateiro seja bastante abundante e capaz de suprir grandes populações bacterianas, em relação a outras plantas como ervilha e milho, uma quantidade significativa não é capaz de ser utilizada, devido ao difícil acesso a esses nutrientes, fazendo com que a competição nesses locais seja reduzida.

Os resultados demonstram que todos os dez antagonistas selecionados foram capazes de reduzir a severidade para os patógenos desafiantes em tomate cv. Santa Clara. O isolado UFV-IEA 6 foi o que apresentou melhores resultados, reduzindo significativamente a severidade da doença, para todos os patógenos (Figuras 1-4). Percebe-se que, na maioria dos casos, há maior eficiência de controle para as doenças que o antagonista foi selecionado (Tabela 1).

Nestes ensaios também foi verificado que UFV-SLA 80 se destacou no controle da pinta-preta (*A. solani*) e requeima (*P. infestans*), UFV-STB 2 no controle da pinta-preta e da mancha-bacteriana pequena (*P. s. pv. tomato*) e UFV-STB 6 no controle da

pinta-preta, requeima e mancha-bacteriana pequena. Por estes resultados, estes isolados foram também selecionados entre os dez melhores, para serem re-testados.

Em etapa seguinte de confirmação dos resultados, repetiram-se os testes em plantas de tomate cv. Santa Cruz 'Kada', utilizando-se os quatro antagonistas selecionados na etapa anterior. Verificou-se mais uma vez que todos foram capazes de reduzir o número de lesões por folíolo, para os patógenos *A. solani*, *P. s. pv. tomato* e *X. vesicatoria* (Figuras 5-7), e que o isolado UFV-IEA 6 se destaca novamente no controle da mancha-bacteriana pequena e mancha-bacteriana (*X. vesicatoria*); UFV-STB 2 para pinta-preta e mancha-bacteriana pequena e UFV-STB 6 para pinta-preta, com eficiência intermediária em relação aos demais patógenos desafiantes, enquanto que UFV-SLA 80 obteve bons resultados no controle da pinta-preta e mancha-bacteriana.

Os dados apresentados demonstram que os quatro antagonistas têm um grande potencial para uso como agentes de biocontrole das doenças para os quais foram selecionados, e que, o isolado UFV-IEA 6, se mantém eficiente tanto em plantas de tomate pertencentes a cv. Santa Cruz 'Kada' quanto a cv. Santa Clara.

O fato dos antagonistas serem capazes de controlar uma ampla gama de doenças de origem fúngica e bacteriana, faz com que seja importante a determinação do(s) mecanismo(s) responsável(is) pela sua eficiência, uma vez que podem estar envolvidos antibiose, parasitismo, competição por nutrientes ou até a indução de resistência, já que a inespecificidade de controle contra doenças causadas por diversos organismos é uma das características deste mecanismo de ação (van Loon *et al.*, 1998).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. 501 p.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**. v. 33, p. 145-172, 1995.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**. v. 89, n. 5, p. 353-359, 1999.

- BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L., ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 7, p. 3328–3338, 2002.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. St. Paul: APS press, 1996. 562 p.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v.60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- LAST, F.T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 38, p. 221-239, 1955.
- LEBEN, C.; Introductory remarks: Biological control strategies in the phylloplane. In: WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS press, p. 1-5, 1985.
- LEBEN, C. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**. v. 78, n. 2, p. 179-185, 1988.
- LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**. v, 13, n. 3, p. 238–243, 2002.
- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, n.1, p.369–374, 2000.
- PRESTON, G.M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. **Molecular Plant Pathology**. v. 1, n. 5, p. 263–275, 2000.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa:UFV, 2001. 279 p.
- ROTEM, J. **The Genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul: APS press, 1994, 326 p.
- RUINEN, J. Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere. **Nature**. v. 177, n.4501, p. 220-221, 1956.
- SCHNEIDER, R.W.; GROGAN, R.G. Tomato leaf trichomes, a habitat for resident populations of *Pseudomonas tomato*. **Phytopathology**. v. 67, n. 7, p. 898-902, 1977.
- 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.
- WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 4, p. 1435–1443, 1999.

Tabela 1 - Antagonistas selecionados em diferentes ciclos de seleção massal, que apresentaram controle satisfatório para pelo menos duas doenças em plantas de tomate cv. Santa Cruz 'Kada'.

<b>Antagonista</b>	<b>Ciclo em que foi selecionado</b>	<b>Doenças controladas</b>
UFV-SLA 6*	1º ciclo	Pinta-preta e Requeima
UFV-STB 6	2º ciclo	Pinta-preta e Requeima
UFV-STA 33	2º ciclo	Mancha-bacteriana pequena e Requeima
UFV-IEA 6	3º ciclo	Mancha-bacteriana pequena e Requeima
UFV-STB 2	4º ciclo	Pinta-preta e Requeima
UFV-STB 30	4º ciclo	Pinta-preta e Mancha-bacteriana pequena
UFV-STB 70	5º ciclo	Pinta-preta e Requeima
UFV-STB 72	5º ciclo	Pinta-preta e Requeima
UFV-SLA 80	6º ciclo	Pinta-preta e Mancha-bacteriana pequena
UFV-STB 78	6º ciclo	Pinta-preta e Requeima

\* As três letras que distinguem os antagonistas significam: S, isolado obtido do terço superior; I, isolado obtido do terço inferior; T, isolado da população total de bactérias do filoplano; L, isolado da população da superfície foliar; E, isolados que habitam locais protegidos do filoplano e/ou que toleram fatores de estresse; A, incubação a 25°C e B, incubação a 18°C. A numeração é aleatória, conforme isolamento.

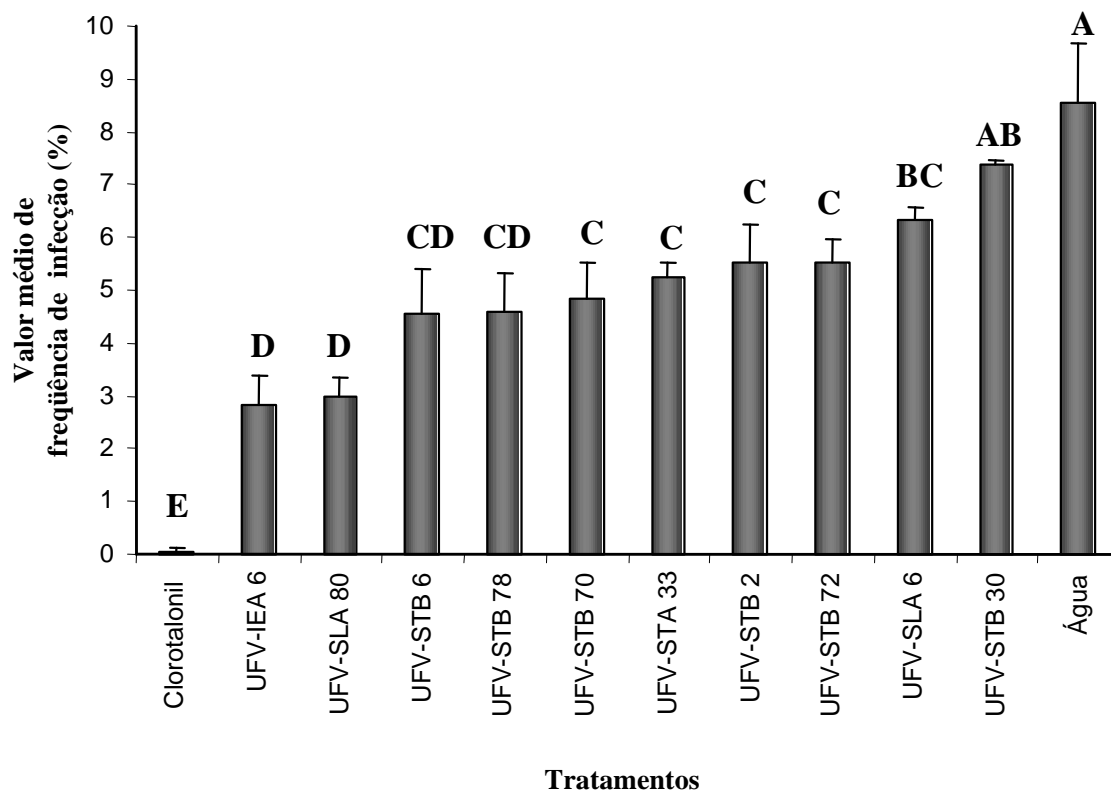


Figura 1 - Valores médios da freqüência de infecção de *Phytophthora infestans* em folíolos de tomateiro cv. Santa Clara, tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

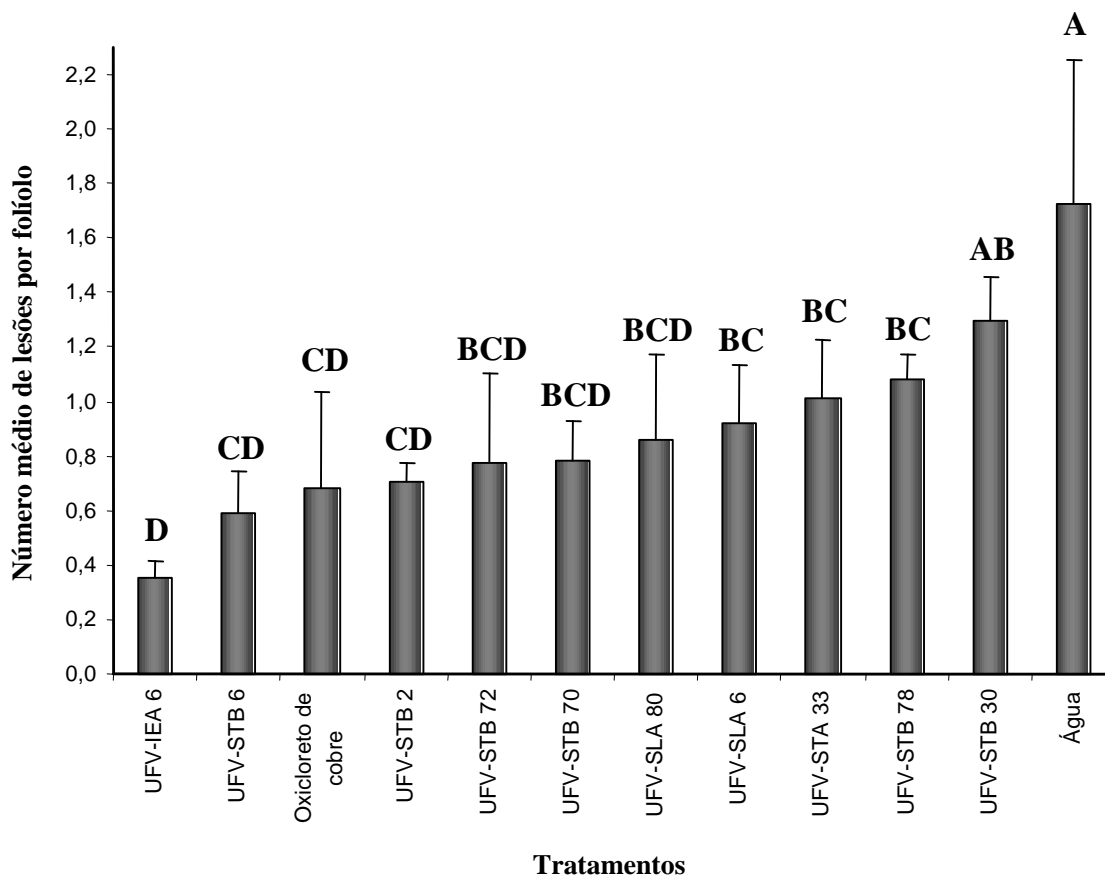


Figura 2 - Número médio de lesões por folíolo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em folíolos de tomateiro cv. Santa Clara, tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

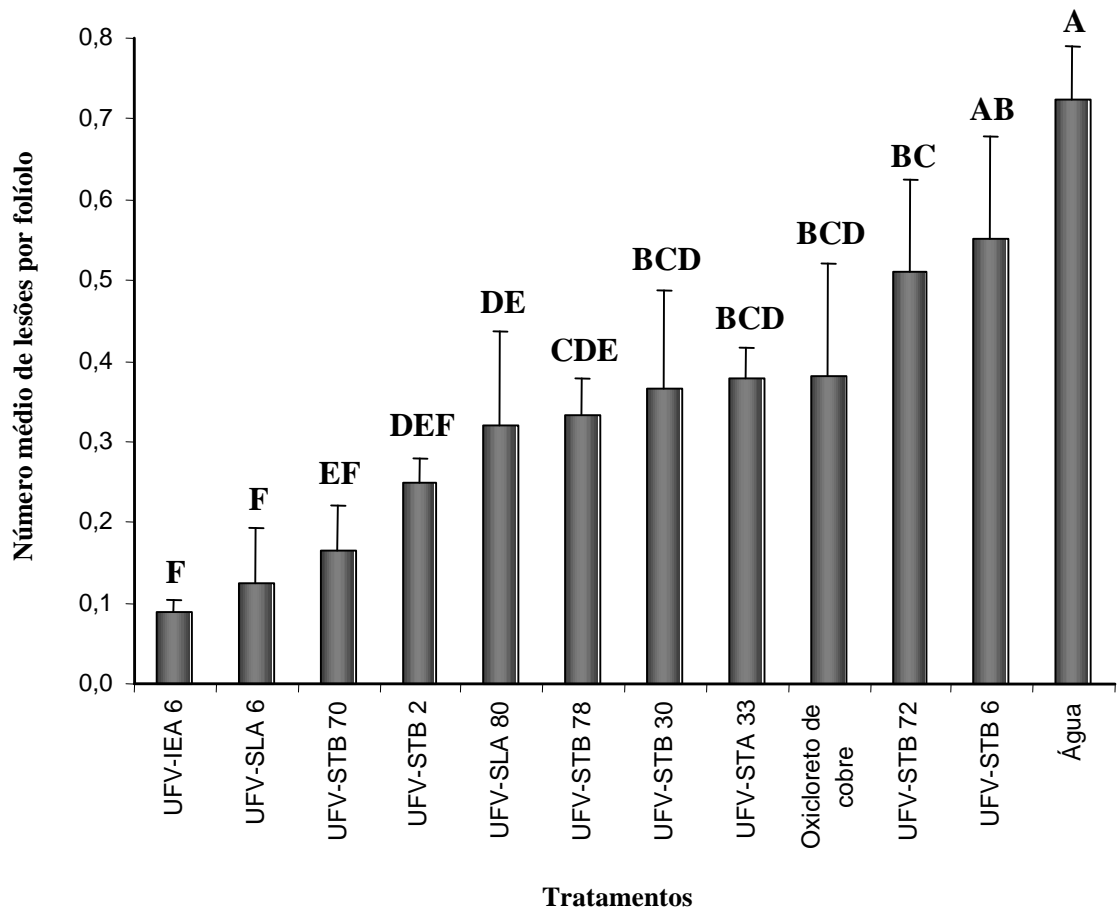


Figura 3 - Número médio de lesões por folíolo de *Xanthomonas vesicatoria* em folíolos de tomateiro cv. Santa Clara, tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

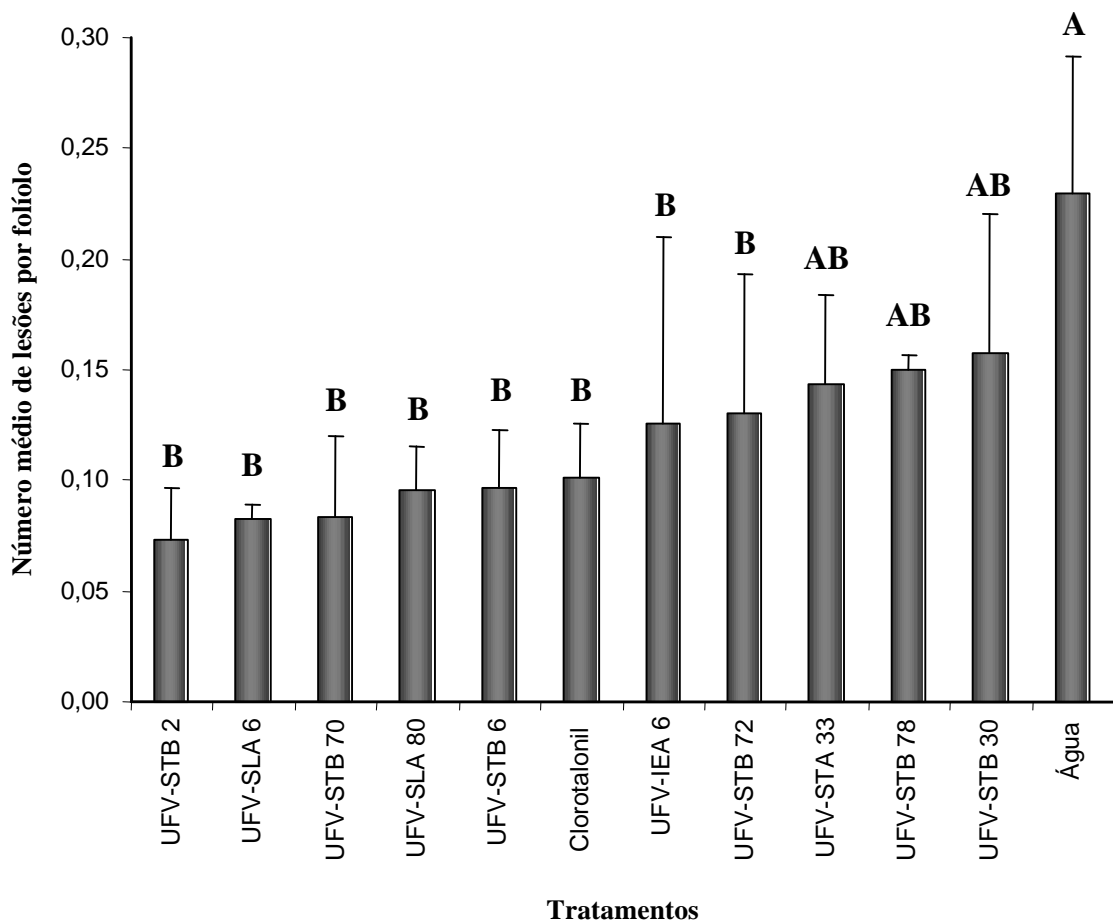


Figura 4 - Número médio de lesões por folíolo de *Alternaria solani* em folíolos de tomateiro cv. Santa Clara, tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

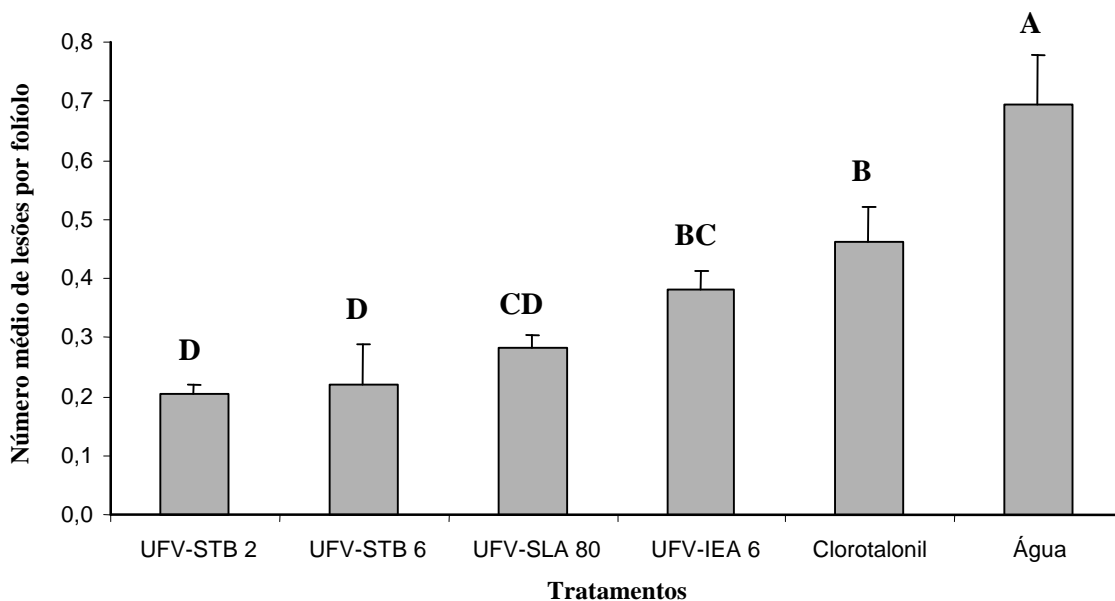


Figura 5 - Número médio de lesões por folíolo de *Alternaria solani* em folíolos de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada', tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

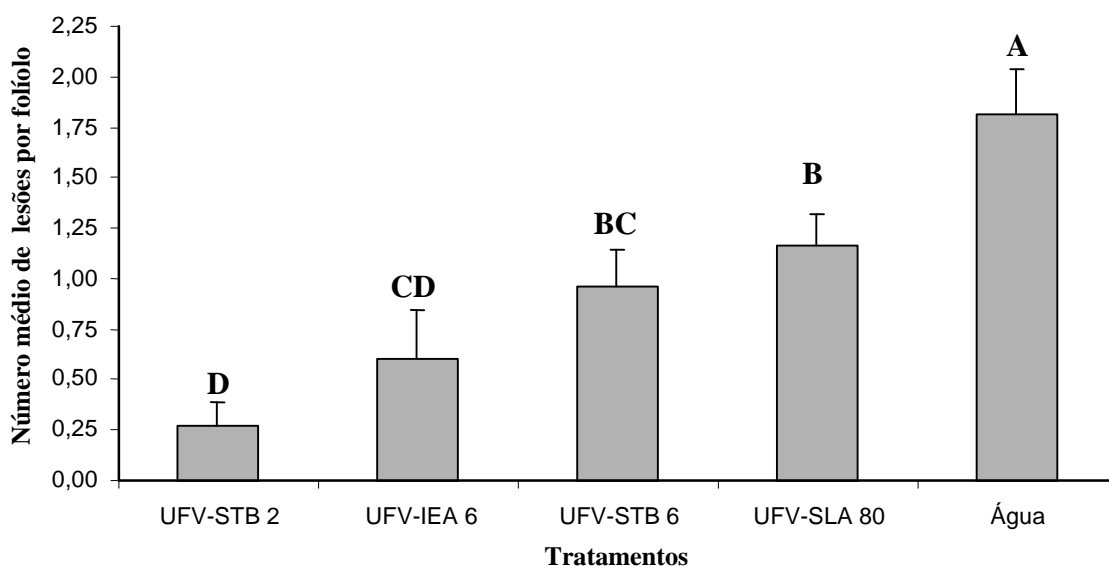


Figura 6 - Número médio de lesões por folíolo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em folíolos de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada', tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

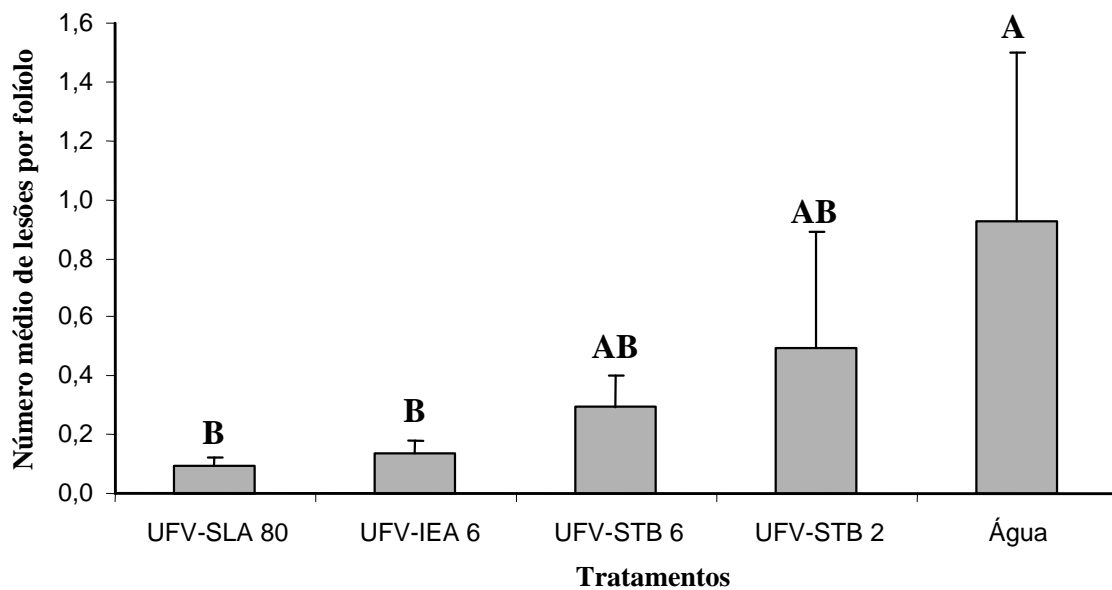


Figura 7 - Número médio de lesões por folíolo de *Xanthomonas vesicatoria* em folíolos de tomateiro cv. Santa Cruz 'Kada', tratados com diferentes antagonistas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

# ANTIBIOSE COMO MECANISMO DE BIOCONTROLE POR BACTÉRIAS DE FILOPLANO DE TOMATEIRO E SUA INADEQUAÇÃO COMO CRITÉRIO DE SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS

## RESUMO

Paralelamente a um processo de seleção de bactérias do filoplano de tomateiro, baseado em ensaios *in vivo*, procurou-se determinar a possibilidade do envolvimento de compostos antimicrobianos no controle de doenças da parte aérea. Verificou-se também o antagonismo entre agentes de biocontrole e capacidade de produção de quitinase. Dos dez antagonistas selecionados, somente um apresentou efeito inibitório sobre a liberação de zoósporos de *Phytophthora infestans*, e dois conseguiram inibir em aproximadamente 90% a germinação de cistos. Para *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas vesicatoria*, somente dois antagonistas foram capazes de inibir o crescimento destes patógenos. Observou-se uma redução da taxa de crescimento, em testes com compostos voláteis, em *P. infestans*, pelo isolado UFV-STB 6 e uma tendência na redução do crescimento de *A. solani*, pelo antagonista UFV-IEA 6. Verificou-se que UFV-IEA 6 foi capaz de produzir quitinase, além de inibir o crescimento de UFV-STB 2 e UFV-STB 6. Os resultados demonstram que, se os testes *in vitro* fossem utilizados como critério de seleção, muitos isolados eficientes não seriam selecionados.

## ABSTRACT

Involvement of antimicrobial compounds in the biocontrol capacity of the selected isolates and antagonism among themselves, and their chitinase production was also determined. Of the 10 selected antagonists, only one showed inhibitory effect on the zoospore liberation of *P. infestans*, and two inhibited cyst germination by about 90%. Only two antagonists inhibited the growth of *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas vesicatoria*. The volatile compounds of the isolate UFV-STB 6 reduced the growth rate of *P. infestans*. There was a tendency for

reduced growth rate of *A. solani* by the isolate UFV-IEA 6, which was capable of producing chitinase, and reduced the growth of the isolates UFV-STB-2 and UFV-STB 6. The results showed that if only *in vitro* tests were used as selection criteria, many efficient isolates may not have been selected.

## INTRODUÇÃO

Entre os diversos mecanismos de controle biológico por bactérias, a antibiose é um dos mais explorados sendo freqüentemente relatado como fator responsável pela eficácia no controle de diversas doenças (Guetsky *et al.*, 2002; Jock *et al.*, 2002; Stockwell *et al.*, 2002). Dentre as substâncias envolvidas na antibiose, as mais conhecidas são as herbicolinas A, B, O e I (Ishimaru *et al.*, 1998; Kempf *et al.*, 1993) e as pantocinas A e B (Wright *et al.*, 2001), excretadas por *Pantoea agglomerans*, além de inúmeras outras moléculas produzidas por isolados de *Pseudomonas* (Sneh *et al.*, 1984; James & Gutterson, 1986; Jayasmal *et al.*, 1990; Kell *et al.*, 1990; Thomashow *et al.*, 1990; Maurhofer *et al.*, 1992; O'Sullivan & O'Gara, 1992; Gaffney *et al.*, 1994).

Muitos pesquisadores consideram a capacidade de produção destes compostos como critério para seleção de agentes de biocontrole (Sleesman & Leben, 1976; Rozsnyay *et al.*, 1992, Montesinos *et al.*, 1996), correndo-se o risco de antagonistas de grande potencial de controle serem descartados. Também podem ser perdidas informações que indiquem quais mecanismos envolvidos no biocontrole são mais efetivos contra cada doença, já que o modo de ação mais eficaz deve ser aquele capaz de afetar fases importantes para o estabelecimento do patógeno, o que varia em cada caso de acordo com as interações em cada patossistema (Handelsman & Stabb, 1996). Adotar uma estratégia de seleção de antagonistas *in vivo*, para depois investigar o mecanismo de ação, poderia evidenciar qual metodologia seria mais adequada na busca de agentes de controle biológico. Mesmo assim, em muitos casos, os modos de ação envolvidos são complexos (Gerhardson, 2002) e difíceis de serem elucidados.

Em um processo prévio de seleção de bactérias do filoplano de tomateiro, em condições de casa-de-vegetação, foi testada a capacidade de trezentos isolados em controlar as doenças causadas por *Alternaria solani* Sorauer, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye &

Wilkie 1978. Foram selecionados os dez antagonistas mais promissores, os quais foram testados novamente contra os mesmos patógenos, verificando-se também sua capacidade em controlar a mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995. Ao final, selecionaram-se os quatro antagonistas mais eficientes para serem melhor investigados.

Neste trabalho, são apresentados os testes de antibiose realizados com todos os isolados bacterianos, utilizados em cada etapa da seleção, visando verificar se a produção de compostos antimicrobianos é o principal mecanismo de ação dos agentes de biocontrole selecionados previamente *in vivo*. Investigou-se também a compatibilidade entre antagonistas eficientes e a adequação da seleção de agentes de biocontrole *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Testes de antibiose

Cada série de cinco dos trezentos candidatos a antagonistas foi semeada, em pontos equidistantes, na superfície do meio 523 (Kado & Heskett, 1970), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, seguindo-se a incubação por 24 h a 25°C. Decorrido este período, colônias surgidas foram expostas a vapor de clorofórmio por 1 h para matar as bactérias e, após volatilização, cada placa recebeu sobre-camada de meio semi-sólido fundente ao qual propágulos de um dos patógenos em teste foi incorporado (Romeiro, 2001). O preparo da sobre-camada a ser adicionada foi feito distintamente para cada organismo.

Para *P. s. pv. tomato*, cada cultura foi cultivada por 24 h a 25°C em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, sendo misturados 300 µL a 30 mL do mesmo meio semi-sólido fundente. Para *A. solani*, as colônias foram crescidas em BDA por 7 dias a 25°C e o micélio com esporos do fungo raspado e misturado ao BDA semi-sólido fundente.

A avaliação da capacidade de inibição foi feita medindo-se a distância entre a periferia da colônia bacteriana e o bordo do halo.

Para *P. infestans*, os ensaios de antibiose foram realizados em lâminas de microscopia. Três anéis de parafina foram fixados em cada lâmina, fundindo-se a parafina e imprimindo o anel com o auxílio de um frasco de penicilina. Suspensões dos candidatos a antagonistas foram ajustadas em espectrofotômetro em absorbância igual a 0,3 em comprimento de onda de 540 nm, depositando-se 120 µL no centro de um dos anéis de parafina em três diferentes lâminas de microscopia utilizando como testemunha água destilada. A seguir, esporângios de *P. infestans* produzidos em fruto de tomate inoculados artificialmente, foram coletados com um estilete e misturados a cada suspensão, depositando-se as lâminas em placas de Petri contendo chumaços de algodão umedecido, incubando-se por 2 h a 18°C e levando para geladeira por mais 19 h. Cada suspensão consistiu de três repetições, sendo cada repetição representada em uma lâmina de microscopia em delineamento inteiramente casualizado.

A capacidade de inibição foi determinada pela contagem de 100 esporângios por amostra ao microscópio ótico, calculando-se o percentual de esporângios que liberaram zoósporos (adaptado de Kong *et al.*, 1997; Halfeld-Vieira *et al.*, 2000). Os resultados foram expressos admitindo-se como referencial a testemunha, com um percentual de esporângios vazios considerado igual a 100%.

Cinco intervalos foram adotados (0-25%; 26-50%; 51-75%; 76-100% e 101-233%), a fim de se classificar cada isolado, de acordo com a percentagem de esporângios vazios registrada.

### **Testes de antibiose com antagonistas obtidos após seleção massal**

Todos os testes de antibiose foram repetidos somente para os dez antagonistas selecionados *in vivo*, fazendo-se também testes adicionais para *Xanthomonas vesicatoria*, da mesma forma realizada para *P. s. pv. tomato*.

Além de ser determinada a percentagem de esporângios que liberaram zoósporos em *P. infestans*, quantificou-se também o percentual de cistos não germinados, seguindo os mesmos critérios experimentais.

As análises estatísticas do teste de antibiose para *P. infestans* foram feitas no programa SAS, versão 8.00, utilizando o proc GLM e teste de Tukey a 5%.

## Testes de antibiose com quatro antagonistas selecionados

Antibiose entre os antagonistas:

Os testes de antibiose entre os quatro melhores antagonistas selecionados *in vivo* foram realizados pelo método da dupla camada, adotando-se o mesmo procedimento utilizado para os patógenos bacterianos, sendo semeado um dos antagonistas na camada basal e o antagonista desafiante incorporado à sobre-camada, em todas as combinações possíveis. A observação de um halo restringindo o crescimento do antagonista desafiante, evidenciou a produção de compostos antimicrobianos pelo antagonista contido na camada basal.

Produção de quitinase:

Foram realizados ensaios visando verificar se os melhores antagonistas são capazes de produzir quitinase. O procedimento adotado utilizou a metodologia descrita por Cattelan (1999).

Teste de antibiose para detecção de compostos inibitórios voláteis:

Para investigar a possibilidade de produção de compostos voláteis inibidores de crescimento, culturas de cada antagonista foram cultivadas a 25°C em meio 523 líquido (Kado & Heskett, 1970) por 24 h. Incorporaram-se 100 µL de cada cultura a 10 mL de meio semi-sólido fundente (Kado & Heskett, 1970), vertendo-se em placas de Petri de 4 cm de diâmetro, e incubando o material a 25°C. As culturas dos patógenos desafiantes foram preparadas após 24 h.

Para os patógenos fúngicos, em placas contendo BDA depositou-se um disco de micélio de *A. solani* ou *P. infestans*, no centro da placa. Para *X. vesicatoria* e *P. s. pv. tomato*, incorporaram-se células ao meio 523 (Kado & Heskett, 1970) semi-sólido fundente, seguindo-se o mesmo procedimento adotado para o semeio dos antagonistas.

Em câmara de fluxo laminar, as tampas das placas foram removidas e o fundo das placas com as culturas contendo um antagonista e um patógeno desafiante, unidas frente a frente e seladas com parafilm. Todas as combinações possíveis entre um antagonista e um patógeno foram testadas.

As placas contendo *A. solani*, *X. vesicatoria* e *P. s. pv. tomato* foram levadas a incubadora a 25°C, e as com *P. infestans* a 18°C. Como controles foram utilizadas culturas dos patógenos combinadas a placas contendo somente o meio de cultura, sem nenhum antagonista desafiante. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, cada repetição constituiu de duas combinações das mesmas culturas.

As avaliações para inibição dos patógenos bacterianos foram realizadas observando se estes eram capazes de crescer quando confrontados com um antagonista após 24 h de incubação. Para *A. solani* e *P. infestans*, foi monitorada a taxa de crescimento micelial ao longo do tempo, medindo-se as colônias com uma régua, em dois eixos ortogonais. Em cada avaliação, foi estimado o diâmetro médio da colônia (Ongena *et al.*, 1999).

Foram calculadas as Áreas Abaixo da Curva de Crescimento Micelial da cultura (AACCM) para cada repetição, submetendo-se a análise estatística com o programa SAS, versão 8.00, utilizando o proc GLM e teste de Tukey a 5%.

## RESULTADOS

### Testes de antibiose durante o processo de seleção

Nos testes de antibiose para *A. solani* e *P. s. pv. tomato*, 274 isolados bacterianos obtidos do filoplano do tomateiro, não produziram nenhum composto antimicrobiano detectável por difusão em ágar. Dos trezentos isolados testados, dez inibiram o desenvolvimento de *A. solani*, doze de *P. s. pv. tomato* e quatro foram capazes de inibir ambos.

Para *P. infestans*, 101 isolados permitiram que 0 a 25% dos esporângios fossem capazes de liberar zoósporos, 36 isolados 26 a 50%, 23 isolados 51 a 75% e 42 isolados 76 a 100%. Por outro lado, 98 apresentaram valores superiores a 100% de liberação de zoósporos.

Nos ensaios considerando somente os dez antagonistas selecionados *in vivo*, observa-se que UFV-IEA 6, UFV-SLA 6, UFV-SLA 80, UFV-STB 2 e UFV-STB 30, não inibiram a liberação de zoósporos de *P. infestans*, ao contrário de UFV-STB 72

(Figura 1). Entretanto, percebe-se que UFV-STB 6 e UFV-STB 70 conseguiram inibir em aproximadamente 90% a germinação dos cistos, seguidos de UFV-SLA 80 e UFV-STB 2, com 68 e 64% de inibição, respectivamente.

Nos testes por difusão em agar, o antagonista UFV-SLA 6 inibiu o desenvolvimento de *P. s. pv. tomato* e *X. vesicatoria* com halos de inibição de 2 e 4 mm respectivamente. O isolado UFV-STB 30 apresentou um amplo espectro de inibição, com halos de 3 mm para *A. solani* e *X. vesicatoria* e de 1 mm para *P. s. pv. tomato*.

### **Antibiose entre os antagonistas selecionados**

O isolado UFV-IEA 6, quando desafiado pelos antagonistas UFV-STB 2 e UFV-STB 6, foi capaz de restringir o seu desenvolvimento, evidenciado pela observação de halos de inibição de 5 e 4 mm respectivamente. Por sua vez, o isolado UFV-STB 6 apresentou um halo pouco nítido com 5 mm, quando desafiado pelo antagonista UFV-IEA 6.

### **Produção de quitinase**

A digestão da quitina, em meio para teste de produção de quitinase, evidenciou a capacidade do isolado UFV-IEA 6 em produzir esta enzima. Houve formação de um halo transparente em torno da colônia semeada, enquanto os demais não a produziram.

### **Antibiose por compostos inibitórios voláteis**

A produção de compostos voláteis capazes de reduzir a taxa de crescimento foi verificada para o isolado UFV-IEA 6 que reduziu significativamente a AACCM para *A. solani*. Outros três tiveram atividade intermediária em relação à testemunha (Figura 2). Para *P. infestans*, somente o antagonista UFV-STB 6 foi capaz de reduzir a taxa de crescimento micelial, com eficiência (Figura 3). Para os patógenos bacterianos não foi verificado nenhum efeito de inibição.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que, nas condições testadas, poucas bactérias do filoplano de tomateiro são capazes de produzir substâncias que restringem os patógenos *A. solani* e *P. s. pv. tomato* enquanto que para *P. infestans*, existiu um equilíbrio entre a representatividade de populações que apresentam um grau de inibição em torno de 25% e daquelas que aumentaram a liberação dos zoósporos.

Fernando *et al.* (1994) estudando o efeito de *Pseudomonas* spp. em *Colletotrichum coccodes*, observaram que a formação de apressórios era estimulada quando conídios eram colocados em contato com uma suspensão da bactéria, aumentando o número de lesões e a severidade da doença em *Abutilon theophrasti* Medic. Esta observação indica que bactérias nativas do filoplano são capazes de interagir em fases específicas do desenvolvimento de patógenos foliares, podendo alterar sua fisiologia. No caso de *P. infestans*, as populações que estimularam a liberação de zoósporos podem ajudar a compensar o efeito inibitório que outras populações exercem e, de certa forma, atenuá-los.

Verifica-se também que a seleção baseada em testes de inibição *in vitro*, seria inadequada, uma vez que somente dois dos dez antagonistas selecionados foram capazes de inibir o desenvolvimento dos patógenos desafiante, por difusão de compostos em meio de cultura, o que poderia resultar no descarte dos demais. Para *P. infestans*, a situação seria equivalente, já que somente um antagonista inibiu a liberação de zoósporos em valores inferiores a 25% (Figura 1).

Esta situação se agrava ainda mais em relação a compostos voláteis, que normalmente não são levados em consideração, nem nos trabalhos que investigam mecanismos de controle associados a produção de substâncias antimicrobianas (Rozsnay *et al.*, 1992; Montesinos *et al.*, 1996; May *et al.*, 1997). Entretanto, no filoplano, talvez estes compostos não tenham um papel tão importante na inibição de fitopatógenos.

Verifica-se que, embora UFV-IEA 6 não tenha restringido o crescimento de nenhum patógeno por difusão em agar, houve uma redução da taxa de crescimento de *A. solani* no estudo de inibição por compostos voláteis (Figura 2). Porém, o acúmulo de CO<sub>2</sub>, favorecido nas condições experimentais, pode ter sido o responsável pela diminuição na taxa de crescimento, pelos três antagonistas testados e por UFV-IEA 6, já

que o desenvolvimento de culturas de *Alternaria* spp. é reduzido em altas concentrações de CO<sub>2</sub> (Smart *et al.*, 1992).

Ishimaru *et al.* (1988), trabalhando com herbicolas produzidas por *P. agglomerans*, demonstraram que diferentes substâncias contidas em meio de cultura podem interferir na atividade de substâncias antimicrobianas. Os autores verificaram que uma das formas purificadas, a herbicolina O, teve sua eficiência reduzida quando o aminoácido L-histidina estava presente e inativada em condições de baixo pH, o que não aconteceu com a herbicolina I que somente teve sua atividade comprometida quando em condições alcalinas. Este exemplo demonstra claramente a fragilidade dos testes de antibiose *in vitro*, já que condições do meio podem afetar substancialmente a atividade de substâncias antimicrobianas.

Um fato interessante é que o antagonista UFV-IEA 6 foi capaz de produzir quitinase, porém sem efeito detectável para *A. solani* com a técnica de difusão em ágar. Uma das possibilidades é que o antagonista tenha produzido quantidades muito pequenas desta enzima já que a produção de quitinase normalmente é estimulada pela presença de quitina (Zhang & Yuen, 2000a; Zhang & Yuen, 2000b) ou inibida por substâncias adicionadas ao meio de cultura (De Boer *et al.*, 1998). Entretanto, em muitos casos, a inibição do crescimento fúngico não está correlacionada com a produção de quitinases. De Boer *et al.* (1998) demonstraram que, embora diversas bactérias tenham sido capazes de produzir quitinase *in vitro*, muitos fungos foram capazes de crescer nos locais onde a presença da enzima foi detectada, concluindo-se que a sua produção não implica necessariamente em uma atividade anti-fúngica.

No caso do antagonista UFV-STB 6, houve uma evidenciação do efeito inibitório da germinação de cistos, quando em suspensão, e na taxa de crescimento micelial de *P. infestans* por voláteis, indicando que a sua eficiência em controlar a doença se deve, pelo menos em parte, à produção destes compostos.

Nos testes de antibiose entre antagonistas, verifica-se que UFV-IEA 6 é capaz de restringir o desenvolvimento de dois outros isolados UFV-STB 2 e UFV-STB 6, o que pode lhe dar uma vantagem durante a colonização, inclusive de sítios protegidos do filoplano, que oferecem maior estabilidade ambiental e oferta de nutrientes (Beattie & Lindow, 1999; Mercier & Lindow, 2000), entretanto, estas incompatibilidades podem vir a limitar o uso de misturas de antagonistas. Reciprocamente, UFV-STB 6 tem alguma capacidade em inibir UFV-IEA 6.

Os resultados demonstram claramente que uma seleção baseada somente em testes *in vitro* não são adequados pois não houve uma correlação clara entre antibiose e seleção de agentes de biocontrole *in vivo*, utilizando bactérias habitantes de filoplano de tomateiro. Estes testes se mostraram úteis somente com a finalidade de elucidar se antibiose pode ser um dos mecanismos de ação envolvidos no biocontrole *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**. v. 89, n. 5, p. 353-359, 1999.
- BULL, C.T.; WADSWORTH, M.L.; SORENSEN, K.N.; TAKEMOTO, J.Y.; AUSTIN, R.K.; SMILANICK, J.L. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. **Biological Control**. v. 12, n. 2, p. 89-95, 1998.
- CATTELAN, A.J. **Métodos Quantitativos Para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36 p.
- DE BOER, W.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; LAFABER, P.; JANSE, J.D.; SPIT, B.E.; WOLDENDORP, J.W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 30, n. 2, p. 193-203, 1998.
- FERNANDO, W.G.D.; WATSON, A.K.; PAULITZ, T.C. Phylloplane *Pseudomonas* spp. enhance disease caused by *Colletotrichum coccodes* on velvetleaf. **Biological Control**. v. 4, n. 2, p. 125-131, 1994.
- GAFFNEY, T.D.; LAM, S.T.; LIGON, J.; GATES, K.; FRAZELLE, A.; DI MAIO, J.; HILL, S.; GOODWIN, S.; TORKEWITZ, N.; ALLSHOUSE, A.M.; KEMPF, H.J.; BECKER, J.O. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. **Molecular Plant Microbe-Interactions**. v. 7, n. 4, p. 455-463, 1994.
- GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**. v.20, n.8, p. 338-343, 2002.
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease supression. **Phytopathology**. v. 92, n. 9, p. 976-985, 2002.

- HALFELD-VIEIRA, B.A.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G.; DEUNER, C.C. Ação *in vitro* de agentes bióticos e abióticos de controle sobre algumas fases do ciclo de vida de *Phytophthora infestans*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.142, 2000 (Abstract).
- HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. **The Plant Cell**. v. 8, n. 10, p. 1855-1869, 1996.
- ISHMARU, C.A.; KLOS, E.J.; BRUBAKER, R.R. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. **Phytopathology**. v. 78, n. 6, p. 746-750, 1988.
- JAMES, D.W.; GUTTERSON, N.I. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 52, n. 5, p. 1183-1189, 1986.
- JANIZIEWICZ, W.J.; TWOROSKI, T.J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**. v.90, n.11, p.1196-1200, 2000.
- JAYASMAL, R.K.; FERNÁNDEZ, M.A.; SCHROEDER III, R.G. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.1053-1058, 1990.
- JOCK, S.; VÖLKSCH, B.; MANSVELT, L.; GEIDER, K. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 211, n. 2, p. 247-252, 2002.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v.60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KELL, C.; WIRTHNER, P.H.; OBERHANSLI, T.H.; VOISARD, C.; BURGER, U.; HASS, D.; DÉFAGO, G. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. **Symbiosis**. v. 9, p. 327-342, 1990.
- KEMPF, H.J.; BAUER, P.H.; SCHROTH, M.N. Herbicolin A associated with crown and roots of wheat after seed treatment with *Erwinia herbicola* B247. **Phytopathology**. v. 83, n. 2, p. 213-216, 1993.
- KONG, G.A.; KOCHMAN, J.K.; BROWN, J.F. Phylloplane bacteria antagonistic to the sunflower pathogen *Alternaria helianthi*. **Australasian Plant Pathology**. v. 26, n. 2, p. 85-97, 1997.
- MAURHOFER, M.; KELL, C.; SCHNIDER, U.; VOISARD, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its suppressive capacity. **Phytopathology**. v. 82, n. 2, p. 190-195, 1992.

- MAY, R.; VÖLKSCH, B.; KAPMANN, G. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in vitro and in planta. **Microbial Ecology**. v. 34, n. 2, p. 118-124, 1997.
- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, n.1, p.369-374, 2000.
- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Field performance of antagonistic bacteria identified in a novel laboratory assay for biological control of fire blight of pear. **Biological Control**. v. 22, n. 1, p. 66-71, 2001.
- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y. BEER, S.V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**. v. 86, n. 8, p. 856-863, 1996.
- ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C.; CORNÉLIS, P.; KOEDAM, N.; BÉLANGER, R.R. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. **Plant Pathology**. v. 48, n. 1, p. 66-76, 1999.
- O'SULLIVAN, D.J.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiological Reviews**. v.56, n.4, p.662-676, 1992.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa:UFV, 2001. 279 p.
- ROZSNYAY, Z.D.; HEVESI, M.; KLEMENT, Z.; VAJNA, L. Biological control against canker dieback diseases of apricots. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**. v. 27, n. 1-4, p. 551-556, 1992.
- SLEESMAN, J.P.; LEBEN, C. Microbial antagonists of *Bipolaris maydis*. **Phytopathology**. v. 66, n. 10, p. 1214-1218, 1976.
- SMART, M.G.; HOWARD, K.M.; BOTHAST, R.J. Effect of carbon dioxide on sporulation of *Alternaria crassa* and *Alternaria cassiae*. **Mycopathologia**. v.118, p.167-171, 1992.
- SNEH, B.; DUPLER, M.; ELAD, Y.; BAKER, R. Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium*-suppressive soil. **Phytopathology**. v.74, n.9, p.1115-1124, 1984.
- STOCKWELL, V.O.; JOHNSON, K.B.; SUGAR, D.; LOPER, J.E. Antibiosis Contributes to Biological Control of Fire Blight by *Pantoea agglomerans* Strain Eh252 in Orchards. **Phytopathology**. v. 92, n. 11, p. 1202-1209, 2002.

- TOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; BONSALE, R.F.; PIERSON III, L.S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.908-912, 1990.
- WRIGHT, S. A. I.; ZUMOFF, C. H.; SCHNEIDER L.; BEER S.V. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 1, p. 284-292, 2001.
- ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**. v. 90, n. 4, p. 384-389, 2000a.
- ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on Biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Biological Control**. v. 18, n. 3, p. 277–286, 2000b.

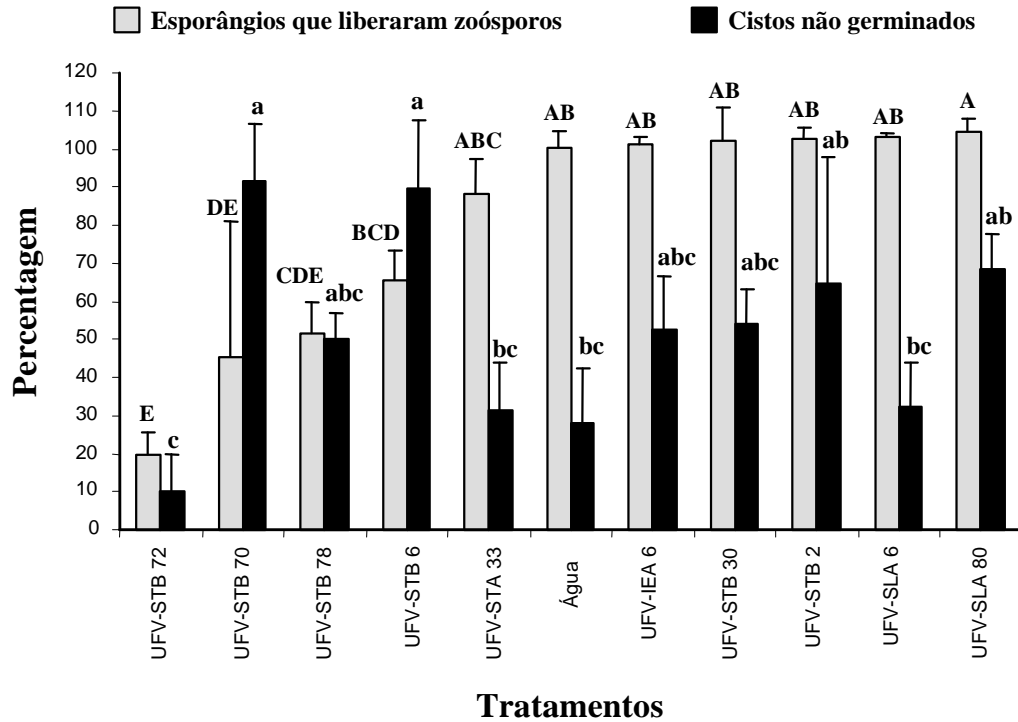


Figura 1 - Teste de antibiose *in vitro* para *P. infestans*, considerando os dez antagonistas selecionados. Barras claras, indicadas por letras maiúsculas, correspondem ao percentual de esporângios capazes de liberar zoósporos, onde valor 100% se refere à testemunha (água). Barras escuras, indicadas por letras minúsculas, correspondem ao percentual de cistos não germinados. Tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

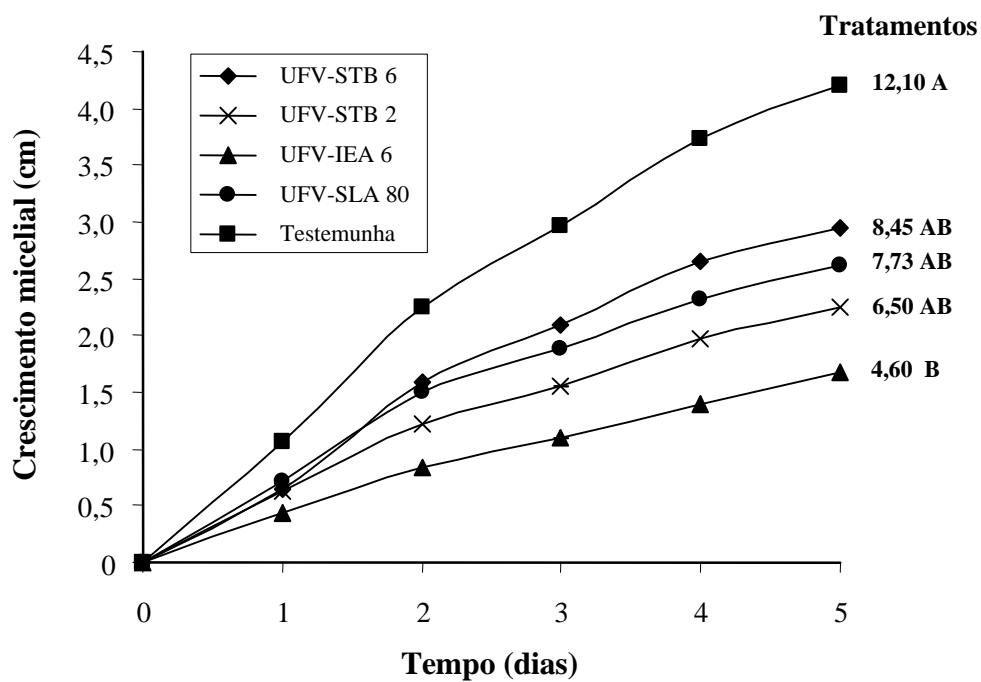


Figura 2 - Crescimento micelial de *A. solani*, quando submetido ao teste de antibiose por compostos voláteis para os 4 antagonistas selecionados. Valores apresentados correspondentes a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

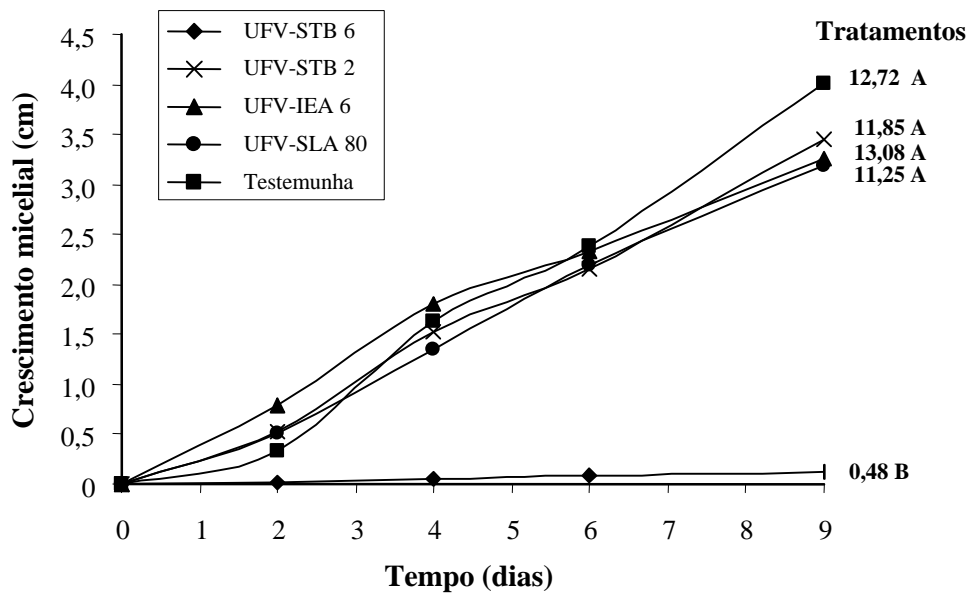


Figura 3 - Crescimento micelial de *P. infestans*, quando submetido ao teste de antibiose por compostos voláteis para os 4 antagonistas selecionados. Valores apresentados correspondentes a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

# CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO BACTERIANOS OBTIDOS DO FILOPLANO DE TOMATEIRO

## RESUMO

Visando explorar ao máximo as potencialidades que um agente de controle biológico oferece, foram caracterizadas quatro bactérias do filoplano de tomateiro selecionadas para o controle das doenças causadas por *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas vesicatoria*. Os resultados demonstraram que um isolado é Gram-negativo e os outros três Gram-positivos, sendo um capaz de formar endósporos, o que lhe confere vantagens na formulação e sobrevivência no ambiente. Verificou-se também a morfologia das células, dimensões celulares e relação com oxigênio. Testes de hipersensibilidade em fumo indicaram que provavelmente nenhum dos agentes de biocontrole é potencialmente fitopatogênico. Foram obtidas equações que permitem estimar a relação entre unidades formadoras de colônias e absorvância lida em espectrofotômetro, através da determinação das curvas de crescimento de cada isolado.

## ABSTRACT

In order to explore the maximum potential a biocontrol agent can offer, four tomato phylloplane bacteria selected to control *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. infestans* and *Xanthomonas vesicatoria* were characterized. The results showed that one isolate is Gram-negative and the other three are Gram-positive, one being able to form endospores, which gives it an advantage in formulations and environmental survival. Cell morphology and dimensions and oxygen relations were also determined. Hypersensitivity testes on tobacco indicated that none of the selected biocontrol agent is potentially a phytopathogen. Equations were obtained to allow for estimation of the relationship between the number of colony forming units and spectrophotometric absorbance, using the growth curve of each isolate.

## INTRODUÇÃO

Para explorar ao máximo as potencialidades que um agente de controle biológico oferece, sua caracterização é de fundamental importância, pois ajuda a evidenciar suas propriedades biológicas e atributos constitutivos. Em se tratando de organismos bacterianos, determinar curvas de crescimento, relações entre turbidimetria e concentração de células viáveis e capacidade de causar reação de hipersensibilidade (HR) são fatores essenciais a serem investigados, pois influem diretamente na padronização de formulações e indicam possíveis riscos a culturas agrônomicas.

Da mesma forma, saber se esses são capazes de formar endósporos e ter uma rápida taxa de multiplicação, é um modo de conhecer sua capacidade de sobrevivência e estabilidade no ambiente, além de viabilizar sua multiplicação em escala comercial (Driks, 1999; 2002). Estas informações também podem indicar se misturas com outros agentes de biocontrole são adequadas, aproveitando-se diferentes propriedades que cada um tem em responder a diferentes condições ambientais, permitindo a predominância de pelo menos uma das populações na cultura a ser protegida (Vanneste *et al.* 1994; Commare *et al.*, 2002).

Um outro fator importante é a possibilidade de se fazer inferências sobre mecanismo de controle envolvido, amplitude de controle potencial e aspectos ecológicos em geral. Principalmente porque existe um conhecimento prévio de espécies que são freqüentemente relatadas no biocontrole de diversas doenças como *Pantoea agglomerans*, (Kempf & Wolf, 1989; Sujkowski *et al.*, 1994; Montesinos *et al.*, 1996), *Stenotrophomonas maltophilia* (Giesler & Yuen, 1998; Zhang & Yuen, 2000), *Pseudomonas* spp. (Montesinos *et al.*, 1996, Krishnamurthy & Gnanamanickam, 1998) e *Bacillus* spp. (Walker & Abraham, 1970; Sengupta *et al.*, 1971; Gross *et al.*, 1973; Guetsky *et al.*, 2002).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar diversos aspectos biológicos de quatro agentes de biocontrole com potencial para uso agrícola, selecionados a partir de um total de trezentas bactérias de filoplano de tomateiro, para o controle das doenças causadas por *Alternaria solani* Sorauer, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 e *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização dos antagonistas

A caracterização dos antagonistas foi feita com base em diversos testes a partir de culturas crescidas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido por 24 h a 25°C.

Para observação da morfologia celular e medições das suas dimensões, foram preparados esfregaços e os isolados UFV-IEA 6, UFV-STB 2 e UFV-STB 6 corados com safranina 2% e UFV-SLA 80 pelo método de Benians (Conn *et al.*, 1957), o que permitiu uma visualização mais adequada.

Para determinação das dimensões celulares, utilizou-se micrômetro ótico acoplado ao microscópio, medindo-se o comprimento e largura de 20 células por lâmina, que não apresentaram evidências de estar em processo de divisão celular.

O teste de Gram foi realizado através de coloração e por solubilidade em KOH (Schaad *et al.*, 2001). A capacidade de formar endósporos foi avaliada a partir de culturas com 7 dias de crescimento em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) por coloração com verde de malaquita e safranina (Schaad *et al.*, 2001).

A capacidade de produzir pigmento fluorescente difusível foi verificada com a visualização da cultura em luz UV a 366 nm, segundo metodologia descrita por Schaad *et al.* (2001).

A relação com oxigênio foi verificada semeando-se os isolados na superfície do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) em placas de Petri, levando-se imediatamente para jarra de anaerobiose (Difco, Anaerobic system), para estabelecer um ambiente desprovido de oxigênio, seguindo-se incubação a 25°C. A viabilidade das culturas foi atestada, semeando-se cada isolado nas mesmas condições, porém fora da jarra de anaerobiose, em ambiente aeróbio. A capacidade de crescimento da cultura dentro da jarra de anaerobiose, indicou tratar-se de bactéria anaeróbia facultativa, enquanto o não crescimento indicou ser aeróbia estrita. As avaliações foram feitas por até 7 dias.

Os testes de HR em fumo (*Nicotiana tabacum*) foram realizados injetando-se no mesófilo, com o auxílio de uma seringa hipodérmica, suspensões concentradas de cada antagonista, preparadas com solução salina estéril, a partir de culturas crescidas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) após 24 h. As folhas foram identificadas de acordo com o isolado bacteriano infiltrado e as plantas mantidas em casa-de-vegetação até

serem avaliadas após 24, 48 h (Schaad *et al.*, 2001) e 1 semana, com a finalidade de verificar patogenicidade a plantas de fumo.

Todos os testes citados foram realizados com três repetições e confirmados por duas vezes.

Após conhecimento prévio das características de cada isolado, através dos testes anteriores, investigações sobre a utilização de fontes de carbono foram feitas com o uso do kit Biolog, visando obter uma identificação provisória dos isolados. Culturas com 24 h de crescimento, de cada antagonista, foram semeadas em meio Biolog Universal Growth (BUG) e incubadas a 25°C por 24 h. Suspensões foram preparadas, ajustadas, depositadas nas microplacas e incubadas, de acordo com as instruções do fabricante (Biolog, 1999). Para as bactérias Gram-positivas, utilizaram-se placas modelo GP2 MicroPlate™ e, para as Gram-negativas, GN2 MicroPlate™.

As avaliações visuais foram feitas 6 h após a incubação. Após 24 h a avaliação foi feita com o auxílio de equipamento próprio para leitura de placas de ELISA (Titertek Multiskan Plus, versão 2.01) em comprimento de onda 560 nm. A identidade de cada antagonista foi investigada provisoriamente, através da base de dados Biolog Microlog 1, versão 4.01B.

### **Curvas de crescimento e turbidimetria**

Para a determinação das curvas de crescimento de cada antagonista, foram preparadas as culturas em 5 mL em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, por 24 h a 25°C, transferindo-se 50 µL para 200 mL do mesmo meio, contido em Erlenmeyer mantido sob agitação a 140 rpm. Periodicamente, a partir do semeio da cultura, foram realizadas três séries de diluições em fator 1:10, utilizando solução salina (0,85% NaCl) contendo 0,3% de Tween 80 (Romeiro, 2001), onde cada série constituiu uma repetição. Depositaram-se 50 µL obtidos de cada diluição, na superfície do meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970), em placas de Petri de 7,5 cm de diâmetro, procedendo-se ao espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski (Madigan *et al.*, 2000).

Simultaneamente, uma amostra da cultura em crescimento, contida no Erlenmeyer, foi retirada em condições assépticas e submetida à leitura em espectrofotômetro (Hitachi, U-3000) para se determinar a absorbância da amostra em comprimento de onda igual a 540 nm ( $A_{540}$ ) anotando-se as leituras referentes a cada

período de incubação, ao longo do tempo (Dalgaard & Koutsoumanis, 2001). Para padronização do branco, utilizou-se meio de cultura, não semeado.

Durante o processo, a temperatura foi monitorada periodicamente com termômetro colocado junto ao agitador, mantendo-se na faixa de 23-25°C, e as amostragens finalizadas após um período de estabilização dos valores lidos em espectrofotômetro.

Contou-se o número de colônias visíveis por placa após 24 e 72 h de incubação, com a finalidade de se verificar a possibilidade do surgimento de mais colônias. A cada contagem anotou-se o tempo de incubação e a diluição de referência, para fins de cálculo.

Para a confecção da curva de crescimento, foi obtida a média das três repetições referentes a cada semeio e o número de unidades formadoras de colônias (ufc) por mL correspondente. Os valores utilizados para a confecção de cada ponto da curva foram aqueles provenientes de um fator de diluição que proporcionou menor desvio padrão.

Para obtenção de uma equação capaz de associar as leituras em  $A_{540}$  e ufc mL<sup>-1</sup>, os valores de ufc mL<sup>-1</sup> foram transformados em  $\log_{10}$  (ufc mL<sup>-1</sup>) representando-se os valores de  $A_{540}$  no eixo das abscissas e ufc mL<sup>-1</sup> no eixo das ordenadas. Os valores correspondentes, até o final da fase estacionária, foram ajustados ao modelo logístico (Dalgaard & Koutsoumanis, 2001) por regressão não linear, através do programa SigmaPlot 2000 versão 6.00 (SPSS Inc.) elevando-se a equação a base 10, para se estimar diretamente o número de ufc mL<sup>-1</sup> a partir de valores de absorbância. O modelo de equação utilizado para ajuste foi:

$$ufc \text{ mL}^{-1} = 10^{\left( y_0 + \frac{a}{1 + \left( \frac{abs}{x_0} \right)^b} \right)}$$

Onde:

a, b, x<sub>0</sub> e y<sub>0</sub>, são parâmetros;

ufc mL<sup>-1</sup> - o número de unidades formadoras de colônia por mL;

abs - absorbância lida em espectrofotômetro a 540 nm.

O período de geração de cada antagonista foi calculado utilizando-se valores observados na fase exponencial, a partir das equações (Goto, 1992; Madigan *et al.*, 2000):

$$n = \frac{\log M_1 - \log M_0}{\log 2} \quad k = \frac{n}{T_1 - T_0} \quad g = \frac{1}{k}$$

Onde:

n = número de gerações;

$\log M_1 - \log M_0$  = aumento do número de ufc correspondentes ao período  $T_1 - T_0$ ;

k – constante da taxa de crescimento;

g = período de geração.

### **Comparação entre os períodos de geração**

Para uma melhor comparação entre os períodos de geração dos quatro antagonistas foram preparadas culturas em 5 mL de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, por 24 h a 25°C, transferindo-se 50 µL para 200 mL do mesmo meio, contido em Erlenmeyer. Os frascos foram transferidos para banho-maria a 25°C e agitados manualmente a cada 1 h, no momento das leituras, que foram iniciadas quando as culturas atingiram turbidez correspondente à fase exponencial de cada isolado, determinado previamente nas curvas de crescimento. A partir dos valores lidos em espectrofotômetro ( $A_{540}$ ), estimou-se, através das fórmulas pré-determinadas, o número de ufc mL<sup>-1</sup> para cada antagonista, calculando-se os períodos de geração.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A caracterização de cada antagonista (Tabela 1) demonstrou que o isolado UFV-IEA 6 é uma bactéria Gram-positiva, com células em forma de bastonete, com dimensões 3 x 1 µm, dispostas em longas cadeias duplas, esporogênica, com endósporos ovais e subterminais, anaeróbia facultativa. As bactérias UFV-STB 2 e UFV-STB 6 tiveram por características serem Gram-positivas, com células em forma de bastonete,

tipicamente com células unidas duas a duas por um dos pólos, não esporogênica, com dimensões 4,9 x 2,5 µm, anaeróbia facultativa e UFV-SLA 80 uma bactéria Gram-negativa, com células pleiomórficas isoladas, não esporogênica, com dimensões variando de 1,8-4 x 1-2 µm, aeróbia estrita.

Nenhum dos antagonistas foi capaz de produzir pigmento fluorescente difusível, nem causar HR ou qualquer sintoma em fumo, o que reduz a possibilidade de se tratarem de agentes fitopatogênicos (Klement & Goodman, 1967; Goodman & Novacky, 1994; Schaad *et al.*, 2001).

Os dados de utilização de fontes únicas de carbono, fornecidos pelo do kit Biolog (Tabela 2), foram analisados em software e a bactéria UFV-IEA 6 foi identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* com índice de similaridade igual a 0,590. As bactérias UFV-STB 2 e UFV-STB 6 foram identificadas como *Tsukamurella inchonensis* com similaridades de 0,588 e 0,352 respectivamente e UFV-SLA 80 como *Sphingomonas parapaucimobilis* com similaridade de 0,376. Esta identificação entretanto é provisória, devendo ser confirmada posteriormente por técnicas mais precisas, uma vez que o sistema Biolog está sujeito a uma série de fatores que podem resultar em uma identificação incorreta (Heuer & Smalla, 1997; Preston-Mafham *et al.*, 2002).

As curvas de crescimento referentes a cada isolado estão representadas nas Figuras 1 a 4, com as respectivas fórmulas ajustadas, relacionando absorbância e ufc mL<sup>-1</sup>.

O isolado UFV-IEA 6 iniciou a fase de crescimento exponencial 7 h após a incubação, entrando na fase estacionária em 12 h, com período de geração calculado de 30,18 min. O isolado UFV-STB 2 iniciou a fase de crescimento exponencial 5 h após a incubação, e a fase estacionária em 10,5 h, com período de geração calculado de 32,82 min; UFV-STB 6 iniciou a fase de crescimento exponencial 3 h após a incubação, entrando na fase estacionária em 12 h, com período de geração calculado de 49,19 min e UFV-SLA 80 iniciou a fase de crescimento exponencial 6 h após a incubação, e a fase estacionária em 36 h, com período de geração calculado de 157,36 min.

Ao serem comparadas culturas incubadas a 25°C, nas mesmas condições sem agitação constante, verificou-se que o período de geração aumentou em aproximadamente 4 vezes em relação às culturas mantidas sob agitação (Tabela 1). Estes resultados são esperados pois uma maior oxigenação do meio promove um

aumento na taxa de crescimento, tanto para bactérias aeróbias obrigatórias, quanto anaeróbias facultativas (Madigan *et al.*, 2000).

Os isolados UFV-IEA 6, UFV-STB 2 e UFV-STB 6 tiveram os menores períodos de geração nas condições estudadas, em valores que permitem uma rápida multiplicação de células para fins comerciais.

Além desta vantagem, a capacidade de UFV-IEA 6 formar endósporos é favorável, uma vez que estes permitem suportar estresses ambientais como radiação, altas temperaturas, ação de produtos antimicrobianos, além de permitirem sua viabilidade por longos períodos (Driks, 1999; 2002). Esta característica facilita a sua formulação (Emmert & Handelsman, 1999) conferindo uma maior vida de prateleira, um dos fatores que mais restringem a exploração comercial de agentes de biocontrole (Walsh *et al.*, 2001).

Observando-se a correlação entre ufc mL<sup>-1</sup> e A<sub>540</sub> verifica-se que a relação concentração de células viáveis x absorvância varia de acordo com o isolado (Figuras 1 a 4). Para UFV-IEA 6, os valores de A<sub>540</sub>= 0,4 correspondem a um valor estimado de 2,6 x 10<sup>7</sup> ufc mL<sup>-1</sup>; UFV-STB 2, 6,6 x 10<sup>6</sup> ufc mL<sup>-1</sup>; UFV-STB 6, 7,35 x 10<sup>6</sup> ufc mL<sup>-1</sup> e UFV SLA 80, 1,4 x 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>. Estas diferenças se relacionam com as dimensões celulares de cada um, já que aqueles que têm células maiores, como UFV-STB 2 e UFV-STB 6 (Tabela 1), ao interceptarem o mesma quantidade de luz emitida do que aqueles com dimensões menores, terão um número menor de células por volume de meio.

Esta informação alerta para a importância de se determinar as relações entre absorvância e ufc mL<sup>-1</sup>, para cada antagonista, já que normalmente as suspensões são ajustadas adotando-se valores de leitura de referência gerais, o que não determina de fato suas concentrações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIOLOG Biolog Microlog<sup>TM</sup> System, Release 4.0 User Guide. Hayward: Biolog Inc. 1999. 111 p.

- BRAUN-KIEWNICK, A.; JACOBSEN, B.J.; SANDS, D.C. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. **Phytopathology**. v.90, n.4, p.368-375, 2000.
- COMMARE, R.R.; NANDAKUMAR, R.; KANDAN, A.; SURESH, S.; BHARATHI, M.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. **Crop Protection**. v. 21, n. 8, p. 671-677, 2002.
- CONN, H.J.; BARTHOLOMEW, J.W.; JENNISON, M.W. Staining Methods. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. **Manual of Microbiological Methods**. New York: McGraw-Hill, p. 10-41, 1957.
- DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**. v.43, n.3, p.183-186, 2001.
- DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 63, n. 1, p. 1-20, 1999.
- DRIKS, A. Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. **Trends in Microbiology**. v.10, n. 6, 2002.
- EMMERT, E.A.B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**. v. 171, n. 1, p. 1-9, 1999.
- GIESLER, L.J.; YUEN, G.Y. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. **Crop Protection**. v. 17, n. 6, p. 509-513, 1998.
- GOODMAN, R.N.; NOVACKY, A.J. **The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens**. St. Paul: APS press, 1994. 244 p.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.
- GROSS, E.; KILTZ, H. H.; NEBELIN, E. 1973. Subtilin IV: the structure of subtilin Z. **Physiological Chemistry**. v. 354, p. 810-812, 1973.
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**. v. 92, n. 9, p. 976-985, 2002.
- HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiological Methods**. v. 30, n. 1, p. 49-61, 1997.

- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v.60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KEMPF, H.J.; WOLF, G. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. **Phytopathology**. v.79, n.9, p. 990-994, 1989.
- KLEMENT, Z.; GOODMAN, R.N. The role of the living bacterial cell and induction time in the hypersensitive reaction of the tobacco plant. **Phytopathology**. v. 57, n. 3, p. 322-323, 1967.
- KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S.S. Biological Control of Rice Blast by *Pseudomonas fluorescens* Strain Pf7-14: Evaluation of a Marker Gene and Formulations. **Biological control**. v. 13, n. 3, p. 158-165, 1998.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 9 ed., 2000. 1044 p.
- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y. BEER, S.V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**. v. 86, n. 8, p. 856-863, 1996.
- PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDERSON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 42, n. 1, p. 1-14, 2002.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa:UFV, 2001. 279 p.
- SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Eds.) **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3 ed, St. Paul: APS Press, 2001. 373p.
- SENGUPTA, S.; BANERJII, A. B.; BOSE, S. K. G-Glutamyl and D- or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. **Biochemistry Journal**. v. 121, p. 839-846, 1971.
- SUJKOWSKI, L. S.; OPHIR, Y.; FRY, W. E.; BEER, S. V. Antibiotic-producing strain of *Erwinia herbicola* as a potential biological control agent for *Alternaria solani*. **Phytopathology**. v. 84, n. 10, p. 1082, 1994 (Abstract).
- VANNESTE, J.L.; YU, J.; WRIGHT, P.J. The combined use of two biological control agents, *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia herbicola* EH252, as a new strategy to control fire blight. New Zealand Plant Protection Conference. **Proceedings...** 47, p. 325-328, 1994.
- WALKER, J. E.; ABRAHAM, E. P. Isolation of bacilysin and a new amino acid from culture filtrates of *Bacillus subtilis*. **Biochemistry Journal**. v. 118, p. 557-563, 1970.

WALSH, U.F.; MORRISSEY, J.P.; O’GARA, F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. **Current Opinion in Biotechnology**. v.12, n. 3, p. 289–295, 2001.

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**. v. 90, n. 4, p. 384-389, 2000.

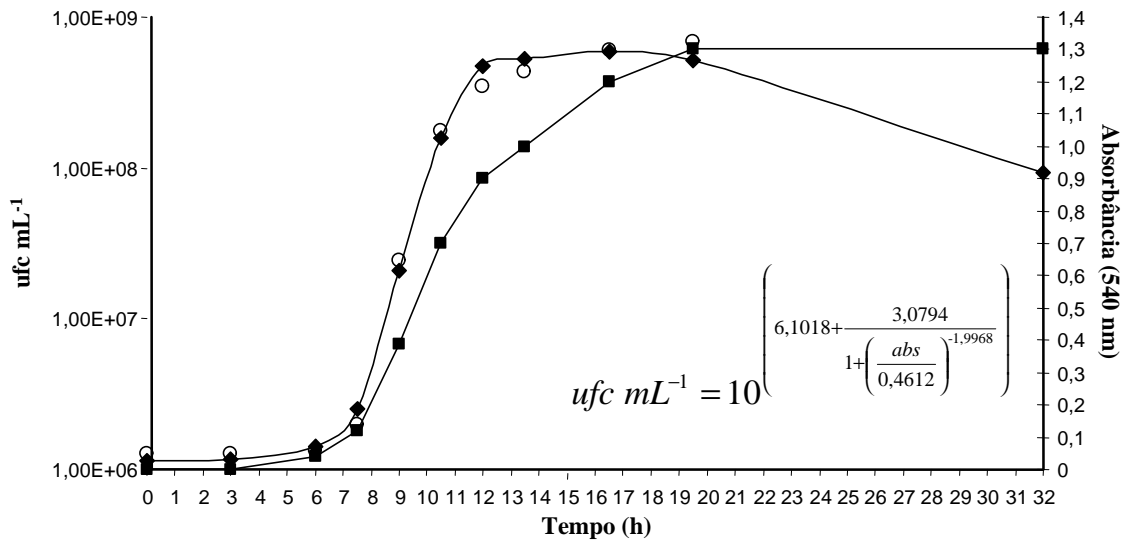


Figura 1 - Curva de crescimento para o isolado UFV-IEA 6 em valores expressos em ufc mL<sup>-1</sup> ( ). Pontos calculados em ufc/ml, a partir de valores de absorbância, segundo a equação apresentada (O). Curva relativa a absorbância lida a 540 nm ( ). Eixo correspondente a ufc mL<sup>-1</sup> em escala logarítmica.

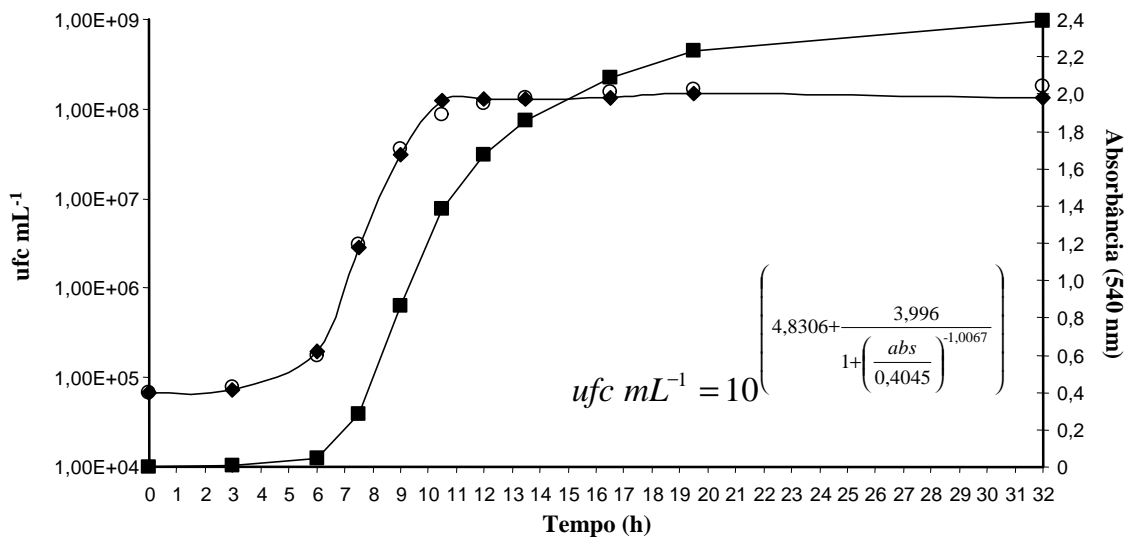


Figura 2 - Curva de crescimento para o isolado UFV-STB 2 em valores expressos em ufc/ml ( ). Pontos calculados em ufc mL<sup>-1</sup>, a partir de valores de absorbância, segundo a equação apresentada (O). Curva relativa a absorbância lida a 540 nm ( ). Eixo correspondente a ufc mL<sup>-1</sup> em escala logarítmica.

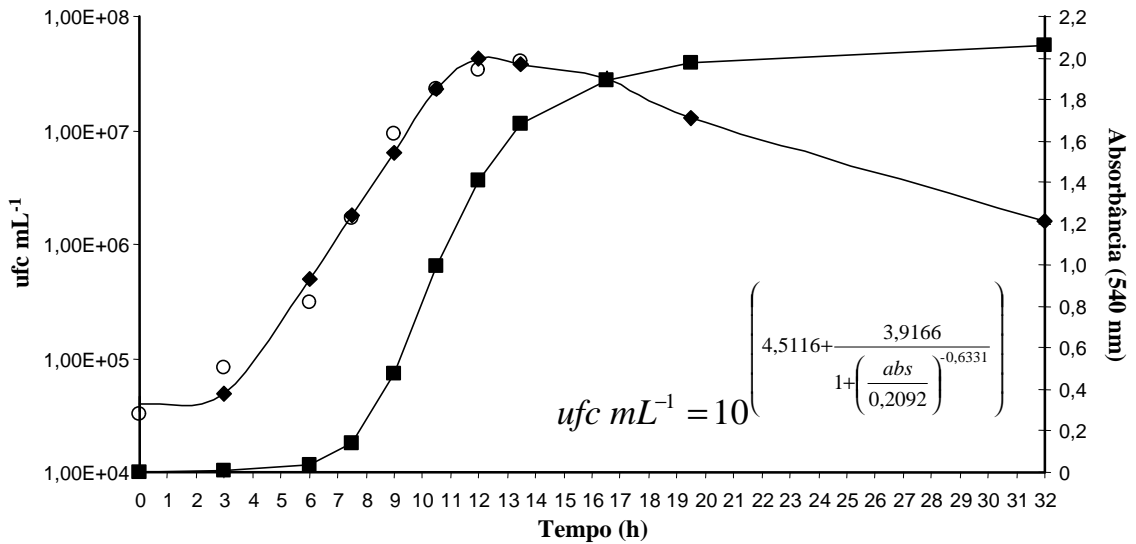


Figura 3 - Curva de crescimento para o isolado UFV-STB 6 em valores expressos em ufc/ml (■). Pontos calculados em ufc mL<sup>-1</sup>, a partir de valores de absorbância, segundo a equação apresentada (○). Curva relativa a absorbância lida a 540 nm (○). Eixo correspondente a ufc mL<sup>-1</sup> escala logarítmica.

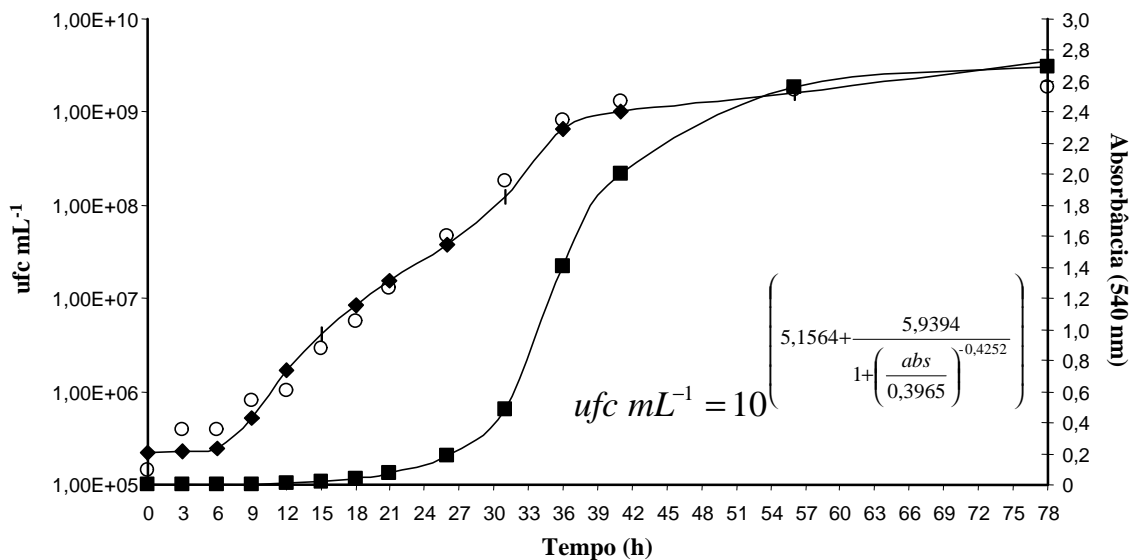


Figura 4 - Curva de crescimento para o isolado UFV-SLA 80 em valores expressos em ufc/ml (■). Pontos calculados em ufc mL<sup>-1</sup>, a partir de valores de absorbância, segundo a equação apresentada (○). Curva relativa a absorbância lida a 540 nm (○). Eixo correspondente a ufc mL<sup>-1</sup> em escala logarítmica.

Tabela 1 - Características dos antagonistas selecionados.

Características	Antagonistas			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
<b>Morfologia</b>	Bastonete	Pleiomórfica	Bastonete	Bastonete
<b>Gram</b>	Gram-positivo	Gram-negativo	Gram-positivo	Gram-positivo
<b>Arranjo</b>	Longas cadeias duplas	Células isoladas	Células unidas duas a duas por um dos pólos	Células unidas duas a duas por um dos pólos
<b>Endósporo</b>	Oval, subterminal	Não esporogênica	Não esporogênica	Não esporogênica
<b>Dimensões (µm)</b>	3 x 1	1,8 - 4 x 1 - 2	4,9 x 2,5	4,9 x 2,5
<b>Relação com oxigênio</b>	Anaeróbia facultativa	Aeróbia estrita	Anaeróbia facultativa	Anaeróbia facultativa
<b>PG (cultura sob agitação)</b>	30,18 min	157,36 min	32,82 min	49,19 min
<b>PG (cultura sem agitação)</b>	122,15 min	617,39 min	123,86 min	184,15 min
<b>HR em fumo</b>	-	-	-	-
<b>Pigmento fluorescente</b>	-	-	-	-

- Resultado negativo; PG= período de geração; HR= Reação de hipersensibilidade.

Tabela 2 - Fontes de únicas de carbono utilizadas no sistema Biolog por cada antagonista.

Fontes de carbono	Antagonistas			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
3-metil-glucose	-	-	+	-
-ciclodextrina	-	+	-	-
-D-glucose	-	+	+	+
-D-lactose	-	+	-	-
Ácido bromo succínico	-	+	-	-
Ácido cítrico	-	+	-	-
Ácido D-glucônico	-	+	-	-
Ácido L-glutâmico	-	+	-	-
Ácido pirúvico	+	-	-	-
Ácido succínico	-	+	-	-
Ácido -ceto glutárico	-	+	-	-
Ácido -ceto valérico	-	-	+	-
b-ciclodextrina	+	-	-	-
b-metil-D-glucosídeo	-	+	-	-
D-celobiose	-	+	-	-
Dextrina	+	+	-	-
D-frutose	-	+	-	-
D-manose	-	+	-	-
D-melibiose	-	+	-	-
D-rafinose	-	+	-	-
D-trealose	-	+	-	-
Gentiobiose	-	+	-	-
Glicose-1-fosfato	-	-	-	+
Hidroxi-L-prolina	-	+	-	-
L-alanil-glicina	-	+	-	-
L-alanina	-	+	-	-
L-alaninamida	-	+	-	-

Tabela 2, Cont.

Fontes de carbono	Antagonistas			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
L-arabinose	-	+	-	-
L-asparagina	-	+	-	-
L-serina	-	+	-	-
Maltose	-	+	+	-
Metil piruvato	-	+	-	-
Mono-metil-succinato	-	+	-	-
Sacarose	-	+	+	-
Turanose	-	+	-	-
Tween 40	+	-	+	+
Tween 80	+	-	+	+

+ Utilização da fonte de carbono; - não utilização da fonte de carbono.

**SENSIBILIDADE DE AGENTES BACTERIANOS DE CONTROLE  
BIOLÓGICO A PRODUTOS ANTIMICROBIANOS E FUNGICIDAS  
AGRÍCOLAS UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATEIRO**

**RESUMO**

Foi estudada a sensibilidade de quatro bactérias do filoplano a compostos antimicrobianos e fungicidas agrícolas utilizados na cultura do tomateiro com a finalidade de fornecer informações para o desenvolvimento de meios semi-seletivos e compatibilizar os agentes de biocontrole no sistema de manejo integrado. Antibiógramas revelaram haver compostos antimicrobianos que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação, em meio de cultura, para elaboração de meios semi-seletivos para estudos com os antagonistas. Todos os isolados foram compatíveis com os fungicidas benomyl, enxofre, dimetomorph e tiofanato-metílico, nas concentrações recomendadas para pulverização, podendo ser expostos a estes produtos em mistura ou em alternância de aplicações.

**ABSTRACT**

Sensibility of the four phylloplane bacteria to antimicrobial compounds and fungicides was also studied to provide information for developing semi-selective media and integrating them with biocontrol agents in the integrated management system. The antibiograms revealed that there are antimicrobial compounds that can be used either alone or in combination, in culture media for the elaboration of semi-selective media for studying the antagonists. All the isolates were compatible with benomyl, sulfur, dimethomorph, and thiophante-methyl, at the concentrations recommended for sprays, thus allowing for their exposure in mixture or in alternate applications.

## INTRODUÇÃO

A compatibilidade entre agentes de controle biológico e produtos antimicrobianos traz várias aplicações práticas, desde a elaboração de meios semi-seletivos para estudos de ecologia e monitoramento de populações a elaboração de estratégias de controle (Kloepper & Beauchamp, 1992; Stockwell *et al.*, 1998; Beattie & Marcell, 2002).

Da mesma forma, a capacidade de combinar antagonistas e fungicidas pode ser um dos meios de otimizar o seu uso, aumentando a eficiência e permitindo a inserção do controle biológico em um sistema de manejo integrado de doenças (Tronsmo & Ystaas, 1980, Korsten *et al.*, 1997). Minuto *et al.* (1995) demonstraram que a mistura de espécies de *Fusarium* antagonistas a um fungicida do grupo dos benzimidazoles aumentou a eficiência de ambos no controle da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. Duffy (2000) verificou que no controle da podridão de raízes, causada por *Rhizoctonia* spp., a aplicação combinada do fungicida pencycuron e a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, em tratamento de sementes de trigo, foi mais eficiente que os tratamentos aplicados separadamente. Um fator importante observado foi que o fungicida não inibiu o crescimento da bactéria *in vitro*, não comprometendo a colonização de raízes, o que permitiu o estabelecimento do agente de biocontrole.

Utilizando diversas estratégias de aplicações entre fungicidas e *Trichoderma harzianum*, no controle do mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* em tomateiro, Elad *et al.* (1995) verificaram que aplicações alternadas foram mais eficientes em controlar a doença que aplicações sucessivas de um único tratamento. Shtienberg & Elad (1997) também utilizaram um sistema de alternância de aplicação de *T. harzianum* e fungicidas, no controle do mofo-cinzento, baseando-se em condições de ambiente para tomada de decisão de qual tratamento deveria ser aplicado em cada momento. Korsten *et al.* (1997), observaram que aplicações alternadas de *Bacillus subtilis* e fungicidas, em pré-colheita, foram capazes de reduzir significativamente a severidade da mancha de *Pseudocercospora purpurea* em abacateiro.

Estas estratégias, além de otimizarem a eficiência dos tratamentos, são um modo de prevenir a seleção de populações de patógenos resistentes a fungicidas, o que reduz a eficiência do controle químico ao longo do tempo (Paulitz & Bélanger, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a quais agentes antimicrobianos quatro bactérias selecionadas para o biocontrole de enfermidades do filoplano do

tomateiro, que demonstraram potencial em controlar as doenças causadas por *Alternaria solani* Sorauer, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 e *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, são insensíveis. Objetivou-se também verificar a compatibilidade desses antagonistas com fungicidas registrados para a cultura do tomateiro, visando adequar os antagonistas ao sistema de manejo integrado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antibiograma

A sensibilidade dos antagonistas aos diversos produtos foi estudada preparando-se culturas de cada antagonista em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido por 24 h, adicionando-se 300 µL da cultura a 30 mL do meio semi-sólido fundente. A mistura foi vertida em placa de Petri de 9 cm de diâmetro e, após solidificado, depositados na superfície do meio, cinco discos de papel por placa contendo substâncias distintas. As placas foram mantidas em incubadora a 25°C por até 48 h quando avaliou-se a presença ou não dos halos de inibição (Romeiro, 2001). A medição dos halos foi realizada com uma régua, a partir da periferia do disco até o bordo do halo.

As substâncias testadas contidas em discos de papel foram as seguintes: Ácido nalidíxico (30 µg), Ác. oxolínico (30 µg), Ác. pipemídico (20 µg), Amicacina (30 µg), Amoxicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Aztreonama (30 µg), Carbenicilina (100 µg), Cefadroxil (30 µg), Cefalexina (30 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepima (30 µg), Cefoperazona (75 µg), Cefotaxima (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Clorotalonil (300 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Cotrimoxazol (25 µg), Eritromicina (15 µg), Estreptomicina (10 µg), Fosfomicina (50 µg), Gentamicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Lincomicina (2 µg), Neomicina (30 µg), Netilmicina (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Norfloxacina (10 µg), Novobiocina (5 µg), Oxacilina (1 µg), Pefloxacina (5 µg), Penicilina (10 µg), Polimixina (300 µg), Rifampicina (5 µg), Sulfazotrim (25 µg), Sulfonamida (300 µg), Tetraciclina (30 µg), Tobramicina (10 µg), Vancomicina (30 µg), Ciclohexamida

(300 µg), Tetrazólio (300 µg), Rosa de Bengala (300 µg), Azul de metileno (300 µg), Cristal violeta (300 µg) e Verde de Malaquita (150 µg).

### **Sensibilidade a antibióticos e fungicidas de uso agrícola**

Preparo das culturas:

As culturas de cada antagonista foram desenvolvidas em 5 mL de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido em tubos de ensaio, por 24 h a 25°C.

Preparo das soluções:

Soluções concentradas das formulações comerciais de cada produto foram preparadas, no momento do uso, em água estéril contida em Erlenmeyer. Obtiveram-se diluições sucessivas em tubos de ensaio, de maneira que, ao ser pipetado 1 mL de cada solução e adicionado a 14 mL de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) semi-sólido fundente, se obtivesse a concentração desejada do ingrediente ativo no meio de cultura (Emery *et al.* 2002).

Os meios foram vertidos em placas de Petri e, após solidificar, 2 µL da cultura de cada um dos quatro antagonistas foram depositados, próximo ao bordo da placa, em pontos equidistantes, fazendo-se três repetições em placas distintas. Para atestar a viabilidade das culturas, cada isolado foi semeado em meio sem adição de nenhuma substância (testemunha) e as avaliações realizadas 24, 48 e 72 horas após o semeio.

A observação de crescimento bacteriano abundante nos locais onde as culturas foram adicionadas indicou a compatibilidade do antagonista com o produto na concentração em teste. O crescimento de poucas colônias demonstrou haver alguma tolerância e nenhum crescimento foi classificado como incompatibilidade.

Foram testados os seguintes produtos em concentrações do ingrediente ativo, pré-determinadas no meio: Benomyl (1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm); Clorotalonil (3200 ppm, 1600 ppm, 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm); Dimetomorph (675 ppm, 337,5 ppm, 168,75 ppm, 84,37 ppm, 42,19 ppm); Enxofre (6000 ppm, 3000 ppm, 1500 ppm, 750 ppm, 325 ppm); Mancozeb (3200 ppm, 1600 ppm, 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm); Metalaxyl (2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm); Mancozeb + Metalaxyl (3000 ppm + 375 ppm, 2000 ppm + 187,5 ppm, 1000 ppm + 93,75 ppm, 500 ppm + 46,875 ppm, 250 ppm +

23,44 ppm); Oxicleto de cobre (3000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm, 625 ppm, 312,5 ppm); Oxitetraciclina + Sulfato de estreptomicina (36 + 360 ppm, 18 + 180 ppm, 9 + 90 ppm, 4,5 + 45 ppm, 2,3 + 23 ppm); Tebuconazole (400 ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm); Sulfato de estreptomicina (120 ppm, 80 ppm, 40 ppm, 20 ppm, 10 ppm) e Tiofanato-metílico (980 ppm, 490 ppm, 245 ppm, 122,5 ppm, 61,25 ppm).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da compatibilidade dos isolados com os antibióticos (Tabela 1) e agroquímicos utilizados na cultura do tomate (Tabela 2) demonstram que os antagonistas são sensíveis a diversos compostos antimicrobianos, provavelmente por terem sido obtidos de plantas não expostas a nenhum produto, em ambiente sem cultivos comerciais. Se alguns produtos testados fossem adicionados ao meio de cultura para o isolamento dos antagonistas (Liu & Wu, 1997; Michaud *et al.*, 2002), estes não teriam sido obtidos, uma vez que foram sensíveis a diversos compostos.

Nas concentrações testadas de cada substância, o isolado UFV-IEA 6 foi insensível a aztreonama, cefepima, cotrimoxazol, oxacilina, sulfazotrim, sulfonamida e ciclohexamida. O isolado UFV-SLA 80 a aztreonama, carbenicilina, clorotalonil, estreptomicina, lincomicina, nitrofurantoína e oxacilina. O isolado UFV-STB 2 a lincomicina e ciclohexamida e UFV-STB 6 a lincomicina, fosfomicina e ciclohexamida (Tabela 1). Observa-se que algumas substâncias podem ser utilizadas sozinhas ou em combinação, como agentes seletivos em meio de cultura, visando o reisolamento dos antagonistas para estudos de dinâmica populacional (Stockwell *et al.*, 1998; Zhang & Yuen, 1999; Ramos *et al.*, 2000), principalmente pela seleção de mutantes espontâneos resistentes a altas concentrações dos produtos (Romeiro, 2001).

Em relação à compatibilidade com antibióticos de uso agrícola (Tabela 2), todos os antagonistas foram sensíveis, sendo UFV-IEA 6 insensível a 2,3 ppm de oxitetraciclina + 23 ppm de estreptomicina e tolerante a 4,5 + 45 ppm. Estes resultados demonstram que a exposição dos antagonistas a estes compostos não seria adequada, uma vez que a dosagem para uso agrícola é de aproximadamente 18 + 183 ppm (Organização Andrei Editora, 1996).

No caso dos fungicidas (Tabela 2), somente o antagonista UFV-SLA 80 foi insensível ao clorotalonil. Todos foram compatíveis com benomyl, dimetomorph, enxofre e tiofanato-metílico. Embora os antagonistas UFV-IEA 6 e UFV-SLA 80 tenham sido sensíveis ao tiofanato-metílico, na concentração de 980 ppm, isto não deve ser considerado como restritivo já que esta concentração é duas vezes superior à recomendada para pulverização (Kimati *et al.*, 1997; Agrofit, 2002).

O crescimento restrito de alguns antagonistas em metalaxyl, oxiclureto de cobre e tebuconazole mostra que existe a possibilidade de serem selecionados mutantes resistentes às doses recomendadas, compatibilizando os agentes de biocontrole com estes produtos.

Existem fungicidas registrados para a cultura, capazes de controlar as principais doenças fúngicas da parte aérea do tomateiro, aos quais podem ser expostos os agentes de biocontrole. Benomyl pode ser usado para *Stemphylium solani*, *Botrytis cinerea* e *Septoria lycopersici*; enxofre para *Oidium lycopersici*; dimetomorph para *P. infestans* e tiofanato-metílico para *Cladosporium fulvum*, *B. cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. lycopersici* (Kimati *et al.*, 1997; Agrofit, 2002).

Esta compatibilidade permite que os antagonistas se insiram no sistema de manejo integrado (van Lenteren, 2000; Kondoh *et al.*, 2001) permitindo a alternância de aplicação (Elad *et al.*, 1995; Korsten *et al.*, 1997) ou a combinação dos antagonistas com fungicidas (Minuto *et al.*, 1995; Duffy, 2000), em que o controle biológico participa como um dos componentes de controle de doenças, podendo-se também aliar a sistemas de previsão em que produtos químicos seriam utilizados somente em casos extremos de grande favorecimento dos patógenos e os agentes de biocontrole aplicados em situações de menor risco (Shtienberg & Elad, 1997).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT **Uso Adequado de agrotóxicos**. In: <http://200.252.165.4/agrofit/> 2002.

BEATTIE, G.A.; MARCELL, L.M. Comparative dynamics of adherent and nonadherent bacterial populations on maize leaves. **Phytopathology**. v. 92, n. 9, 2002.

- DUFFY, B. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of rhizoctonia root rot and take-all of spring wheat. **Crop Protection**. v. 19, n. 1, p. 21-25, 2000.
- ELAD, Y.; GULLINO, M.L.; SHTIENBERG, D.; ALOI, C. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes greenhouses in the mediterranean. **Crop Protection**. v.14, n.2, p.105-109, 1995.
- EMERY, K.M.; SCHERM, H.; SAVELLE, A.T. Assessment of interactions between components of fungicide mixtures against *Monilinia fructicola*. **Crop Protection**. v.21, n. 1, p. 41-47, 2002.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v.60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KIMATI, H.; GIMENES-FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. **Guia de Fungicidas Agrícolas**. 2 ed. v. 1, Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia. 1997. 225 p.
- KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 1219-1232, 1992.
- KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Intergated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 91, n. 2, p. 173-177, 2001.
- KORSTEN, L.; DE VILLIERS, E.E.; WEHNER, F.C.; J.M. KOTZÉ. Field Sprays of *Bacillus subtilis* and Fungicides for Control of Preharvest Fruit Diseases of Avocado in South Africa. **Plant Disease**. v. 81, n. 5, p. 455-459, 1997.
- LIU, C.H.; WU, W.S. Chemical na biological control of tomato early blight. **Plant Pathology Bulletin**. v. 6, p. 132-140, 1997.
- MINUTO, A.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological control and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**. v. 14, n. 3, p. 221-226, 1995.
- MICHAUD, M.; MARTINEZ, C.; SIMAO-BEAUNOIR, A.M.; BÉLANGER, R.R.; TWEDDELL, R.J. Selection of antagonist microorganisms against *Helminthosporium solani*, causal agent of potato silver scurf. **Plant Disease**. v. 86, n. 7, p. 717-720, 2002.
- ORGANIZAÇÃO ANDREI EDITORA **Compêndio de Defensivos Agrícolas**. 5 ed, São Paulo: Organização Andrei Editora, 1996. 506 p.
- PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems **Annual Review of Phytopathology**. v. 39, p. 103-33, 2001.

- RAMOS, C; MOLINA, L.; MØLBAK, L.; RAMOS, J.L.; MOLIN, S. A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 34, n. 2, p. 91-102, 2000.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa:UFV, 2001. 279 p.
- SHTIENBERG, D.; ELAD, Y. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**. v.87, n.3, p.332-340, 1997.
- STOCKWELL, V.O.; JOHNSON, K.B.; LOPER, J.E. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. **Phytopathology**. v. 88, n. 6, p. 506-513, 1998.
- TRONSMO, A., AND YSTAAS, J. 1980. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. **Plant Disease**, v. 64, n. 11, p.1009, 1980.
- VAN LENTEREN, J.C. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? **Crop Protection**. v. 19, n. 6, p. 375-384, 2000.
- ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**. v. 90, n. 9, p. 384-389, 2000.

Tabela 1 - Sensibilidade dos antagonistas a cinquenta substâncias antimicrobianas distintas.

Substâncias testadas	Segmento de raio dos halos de inibição para cada isolado (cm)			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
Ác. nalidíxico (30 µg)	0,9	0,9	0,7	0,9
Ác. Oxolínico (30 µg)	0,7	1	0,7	1,1
Ác. Pipemídico (20 µg)	0,8	0,4	0,7	0,7
Amicacina (30 µg)	1,1	1,4	1,2	1,2
Amoxicilina (10 µg)	0,8	1	0,7	0,8
Ampicilina (10 µg)	0,8	1,1	0,8	0,9
Aztreonama (30 µg)	0	0	0,6	0,6
Carbenicilina (100 µg)	0,1	0	0,1	0,5
Cefadroxil (30 µg)	1,4	1,5	1,4	1,5
Cefalexina (30 µg)	1,2	1,2	1,6	1,6
Cefalotina (30 µg)	1,2	0,4	1,5	1,6
Cefepima (30 µg)	0	0,7	0,9	1,1
Cefoperazona (75 µg)	1	0,2	1	1,3
Cefotaxima (30 µg)	0,3	1,2	1,9	1,5
Cefoxitina (30 µg)	0,3	0,4	0,6	0,7
Ceftriaxona (30 µg)	0,6	1,2	1,9	1,5
Ceftazidima (30 µg)	0,1	1	1,1	1,3
Clorotalonil (300 µg)	0,5	0	0,4	0,2
Ciprofloxacina (5 µg)	1	1,4	0,9	1
Cloranfenicol (30 µg)	1,1	2	1,9	1,4
Cotrimoxazol (25 µg)	0	1,5	1	1,1
Eritromicina (15 µg)	0,5	1	0,9	0,9
Estreptomicina (10 µg)	0,9	0	1	1
Fosfomicina (50 µg)	0,8	1,6	0,6	0
Gentamicina (10 µg)	0,8	1,1	0,9	0,8
Kanamicina (30 µg)	0,9	1,5	1,2	1
Lincomicina (2 µg)	0,4	0	0	0
Neomicina (30 µg)	0,7	1	0,6	0,7
Netilmicina (30 µg)	1	1,5	1,1	1,2

Tabela 1, Cont.

Substâncias testadas	Segmento de raio dos halos de inibição para cada isolado (cm)			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
Nitrofurantoína (300 µg)	0,8	0	0,7	0,7
Norfloxacina (10 µg)	1	1	0,9	0,9
Novobiocina (5 µg)	0,7	1,2	0,6	0,7
Oxacilina (1 µg)	0	0	0,6	1,8
Pefloxacina (5 µg)	1	1,2	1,7	1,1
Penicilina (10 µg)	0,9	0,4	0,9	1
Polimixina (300 µg)	0,3	0,5	0,3	0,5
Polimixina (300 µg)	0,5	0,6	0,4	0,5
Rifampicina (5 µg)	0,7	0,9	1	0,8
Sulfazotrim (25 µg)	0	1,2	0,9	0,9
Sulfonamida (300 µg)	0	1,9	0,6	0,9
Tetraciclina (30 µg)	0,9	1,5	1,1	1,1
Tobramicina (10 µg)	1	1,4	0,8	1
Vancomicina (30 µg)	0,8	1	0,9	0,8
Azul de Metileno (300 µg)	0,5	0,9	0,5	0,5
Ciclohexamida (300 µg)	0	0,1	0	0
Cristal violeta (300 µg)	0,8	0,5	1	0,8
Rosa de Bengala (300 µg)	1,8	0,7	0,8	0,7
Tetrazólio (300 µg)	1,2	1	1,1	1
Verde de Malaquita (150 µg)	1,2	0,9	1,4	1,1

Tabela 2 - Crescimento dos antagonistas quando expostos a diferentes concentrações dos principais antibióticos e fungicidas agrícolas utilizados em tomateiro.

Substâncias testadas	Desenvolvimento horas após o semeio			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
Testemunha	24 h	24 h	24 h	24 h
Benomyl (1000 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Benomyl ( <b>500 ppm</b> )	24 h	24 h	24 h	24 h
Benomyl (250 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Benomyl (125 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Benomyl (62,5 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Clorotalonil (3200ppm)	-	24 h	-	-
Clorotalonil ( <b>1600 ppm</b> )	-	24 h	-	-
Clorotalonil (800 ppm)	-	24 h	-	-
Clorotalonil (400 ppm)	-	24 h	-	-
Clorotalonil (200ppm)	-	24 h	-	-
Dimetomorph (675 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Dimetomorph ( <b>337,5 ppm</b> )	24 h	24 h	24 h	24 h
Dimetomorph (168,75 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Dimetomorph (84,37 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Dimetomorph (42,19 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Enxofre (6000 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Enxofre ( <b>3000 ppm</b> )	24 h	24 h	24 h	24 h
Enxofre (1500 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Enxofre (750 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Enxofre (375 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Mancozeb (3200 ppm)	-	-	-	-
Mancozeb ( <b>1600 ppm</b> )	-	-	-	-

Tabela 2, Cont.

Substâncias testadas	Desenvolvimento horas após o semeio			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
Mancozeb (800 ppm)	-	-	-	-
Mancozeb (400 ppm)	-	-	-	-
Mancozeb (200 ppm)	-	-	-	-
Metalaxyl (2000 ppm)	-	-	-	-
Metalaxyl (1000 ppm)	-	-	-	-
Metalaxyl (500 ppm)	-	-	-	-
Metalaxyl ( <b>250 ppm</b> )	-	-	-	-
Metalaxyl (125 ppm)	-	24 h	24 h	-
Metalaxyl (62,5 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Manc. (3000 ppm)+Metal.(375 ppm)	-	-	-	-
Manc. ( <b>2000 ppm</b> )+Metal.( <b>187,5 ppm</b> )	-	-	-	-
Manc. (1000 ppm)+Metal.(93,75 ppm)	-	-	-	-
Manc. (500 ppm)+Metal.(46,875 ppm)	-	-	-	-
Manc. (250 ppm)+Metal.(23,44 ppm)	-	-	-	-
Oxicloreto de cobre (3000 ppm)	-	-	-	-
Oxicloreto de cobre ( <b>2500 ppm</b> )	-	-	-	-
Oxicloreto de cobre (1250 ppm)	-	-	-	-
Oxicloreto de cobre (625 ppm)	24 h	-	24 h*	24 h*
Oxicloreto de cobre (312,5 ppm)	24 h	-	24 h*	24 h*
Oxitetr. (36 ppm)+Sulf.estrept. (360 ppm)	-	-	-	-
Oxitetr.( <b>18 ppm</b> )+ Sulf.estrept.( <b>183 ppm</b> )	-	-	-	-
Oxitetr.(9 ppm)+ Sulf.estrept.(90 ppm)	-	-	-	-
Oxitetr.(4,5 ppm)+ Sulf.estrept.(45 ppm)	24 h*	-	-	-
Oxitetr.(2,3 ppm)+ Sulf.estrept.(23 ppm)	24 h	24 h*	-	-

Tabela 2, Cont.

Substâncias testadas	Desenvolvimento horas após o semeio			
	UFV-IEA 6	UFV-SLA 80	UFV-STB 2	UFV-STB 6
Tebuconazole (400 ppm)	-	-	-	-
Tebuconazole ( <b>200 ppm</b> )	-	-	-	-
Tebuconazole (100 ppm)	-	-	-	-
Tebuconazole (50 ppm)	-	-	-	-
Tebuconazole (25 ppm)	-	24 h	24 h	48h*
Tiofanato-metílico (980 ppm)	48 h*	48 h*	24 h	24 h
Tiofanato-metílico ( <b>490 ppm</b> )	24 h	24 h	24 h	24 h
Tiofanato-metílico (245 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Tiofanato-metílico (122,5 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h
Tiofanato-metílico (61,25 ppm)	24 h	24 h	24 h	24 h

Valores numéricos se referem ao período no qual se verificou crescimento bacteriano abundante quando submetido a cada tratamento.

Concentrações em negrito são referentes à dose aproximada do ingrediente ativo recomendada para uso agrícola (Organização Andrei Editora, 1996; Kimati *et al.*, 1997; Agrofit, 2002).

-Nenhum crescimento.

\*Pouco crescimento observado.

# **ATIVIDADE DE ENZIMAS INDICADORAS DO ESTADO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E SEU POSSÍVEL ENVOLVIMENTO NO CONTROLE DE PATÓGENOS POR UMA BACTÉRIA DE FILOPLANO DO TOMATEIRO**

## **RESUMO**

Para investigar se a indução de resistência pode estar envolvida como mecanismo de controle exercido por uma bactéria do filoplano de tomateiro, determinou-se a atividade de cinco enzimas indicadoras do estado de indução. As enzimas avaliadas foram peroxidases (PO), lipoxigenases (LOX),  $\beta$ -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidasas (PPO). Os resultados das atividades enzimáticas em tomateiros somente colonizados pela bactéria do filoplano, das plantas somente inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, plantas não colonizadas nem inoculadas, plantas colonizadas e inoculadas após 4 dias, revelaram haver um aumento significativo da atividade de PO no último tratamento. Os resultados indicam que a bactéria do filoplano, possivelmente, pode agir como indutora de resistência, o que parece ser o primeiro caso que se tem conhecimento, de uma bactéria não fitopatogênica do filoplano induzindo resistência na mesma cultura de onde foi obtida.

## **ABSTRACT**

To investigate involvement of resistance induction in the mechanism of disease control provided by one tomato phylloplane bacteria, activity of five indicator enzymes was studied. The enzymes evaluated were peroxidase (PO), lipoxigenase (LOX),  $\beta$ -1,3-glucanases, phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO). The results of the enzymatic activity in tomato plants colonized only by the phylloplane bacteria, by the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, non-inoculated and non-colonized plants, or colonized and inoculated plants, after four days, revealed a significant increase in PO activity in the last treatment. The results indicated that phylloplane bacteria probably can act as resistance inducers, which appears to be the first case of a

non-pathogenic phylloplane bacterium inducing resistance in the same crop from which it was isolated.

## INTRODUÇÃO

O estudo da indução de resistência, seja pela ação de ativadores bióticos ou abióticos, (Walling, 2001; Bounario *et al.*, 2002; Prats *et al.*, 2002) é um dos mecanismos de controle de doenças que mais vêm sendo investigado. Dentre os agentes bióticos capazes de induzir resistência, as rizobactérias são os organismos mais estudados (van Loon *et al.*, 1998). Embora suspeite-se de que bactérias de um modo geral possam agir como indutoras de resistência, não se tem conhecimento de nenhuma bactéria do filoplano capaz de ativar resistência e os resultados disponíveis com bactérias em fase residente (Martins *et al.*, 1985; Bettiol & Várzea, 1992; Cristancho-Ardila & Leguizamón-Caycedo, 1995) muitas vezes não têm sido consistentes.

A exploração das potencialidades de bactérias do filoplano como ativadoras de resistência vem ampliar as possibilidades de controle de doenças em um sistema de manejo integrado. Em um processo de seleção de bactérias do filoplano de tomateiro, diversos estudos foram realizados com a finalidade de se determinar qual fator seria responsável pela eficiência de um antagonista (UFV-IEA 6) em promover o biocontrole experimental de uma ampla gama de doenças, como as causadas por *Alternaria solani* Sorauer, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary e *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (Halfeld-Vieira *et al.*, 2002a). Os testes de antibiose *in vitro* não permitiram correlacionar eficiência *in vivo* com a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana (Halfeld-Vieira *et al.*, 2002b). Além disso, a capacidade de controlar diversas doenças de origens distintas é um indício de que o mecanismo de controle envolvido não é específico, uma característica da indução de resistência sistêmica (Sticher *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998), no qual uma das formas de ser evidenciado é através da quantificação da atividade de enzimas específicas indicadoras do estado de indução, envolvidas na defesa (Chen *et al.*, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar se o mecanismo de indução de resistência pode explicar o modo de ação do antagonista, através da determinação de alterações na

atividade de cinco enzimas indicadoras do estado de indução. As peroxidases estão envolvidas na resposta de hipersensibilidade (HR) (Martinez *et al.*, 1998), síntese de lignina e suberina (Quiroga *et al.*, 2000) por oxidação de compostos fenólicos (van Huystee, 1987); as lipoxigenases, envolvidas na peroxidação de lipídeos da membrana e na resposta de hipersensibilidade (Porta & Rocha-Sosa, 2002); as  $\beta$ -1,3-glucanases são capazes de desencadear os mecanismos de defesa da planta, além de terem efeito direto sobre o patógeno (Keen & Yoshikawa, 1983; Mauch *et al.*, 1988; van Loon *et al.*, 1994). Fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidasas estão envolvidas na rota biossintética dos fenilpropanóides, sendo, a primeira, produtora de fenólicos como flavonóides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzóico (Bate *et al.*, 1994; Dixon & Paiva, 1995; Howles *et al.*, 1996; Sarma *et al.* 1998; Sharan *et al.*, 1998), e a segunda capaz de sinetizar quinonas, por meio da oxidação de fenóis (Duangmal & Apenten, 1999; Li & Steffens, 2002).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e tratamentos

Foram utilizadas plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz 'Kada' com cinco folhas desenvolvidas, cultivadas em vasos independentes, com capacidade para 500 mL. Uma suspensão de células do agente de biocontrole UFV-IEA 6 foi preparada a partir de uma cultura de 24 h de crescimento em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) a 25°C, com absorvância ajustada a 0,3 em espectrofotômetro (Hitachi, U-3000) utilizando comprimento de onda igual a 540 nm ( $A_{540}$ ). Um grupo de dezesseis plantas foi pulverizado com a suspensão de células bacterianas previamente preparada e outro grupo de igual tamanho pulverizado somente com água.

Quatro dias após, oito plantas de cada grupo foram inoculadas por pulverização com uma suspensão de *P. s. pv. tomato* ( $A_{540} = 0,15$ ), levando-se para câmara úmida por 24h a 25°C. Ao serem observados os primeiros sintomas, foram coletados aleatoriamente 30 folíolos do terço médio de cada grupo de oito plantas, que constituiu um tratamento. Cada 10 folíolos foram embrulhados em papel alumínio, acondicionados dentro de envelopes de papel pardo, identificados de acordo com o tratamento a que

foram submetidos e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , constituindo-se uma amostra de cada repetição em um total de 3 repetições por tratamento

Os tratamentos foram: plantas somente pulverizadas com água (A); plantas somente colonizadas com o antagonista UFV-IEA 6 (C); plantas somente inoculadas com *P. s. pv. tomato* (I) e plantas colonizadas e inoculadas após 4 dias (CI).

Três ensaios foram realizados para cada enzima, em cada amostra. Utilizou-se a média dos três ensaios para representar uma repetição de um tratamento.

### **Preparo do extrato vegetal**

Cada amostra de folíolos foi triturada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, adicionando-se ao macerado uma solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, polivinilpirrolidona 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM, na proporção de 3 mL do tampão de extração para cada grama de amostra. O preparado foi centrifugado (Du Pont, Sorvall RC-5B) a 20.000 g por 25 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e os sobrenadantes, coletados e mantidos em banho de gelo durante os ensaios enzimáticos (Baracat-Pereira *et al.*, 2001).

### **Determinação de proteínas totais**

A concentração de proteínas totais em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976) ajustando-se uma curva padrão, determinada previamente com uso de soluções com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina, correlacionando-se a concentração de proteínas com leituras de absorvância, em espectrofotômetro a 595 nm (Alfenas *et al.*, 1998). Os dados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de proteínas. $\text{g}^{-1}$  tecido.

### **Ensaio para determinação da atividade de Peroxidases (PO)**

A atividade de peroxidases foi determinada por método espectrofotométrico a 470 nm (Hammerschmidt *et al.*, 1982) em que o guaiacol participa como doador de hidrogênio (Hammerschmidt *et al.*, 1982; Martinez *et al.*, 1998) formando tetraguaiacol (Caruso *et al.*, 2001). A mistura de reação consistiu de 1019  $\mu\text{l}$  de uma solução de

substrato contendo 125  $\mu\text{l}$  guaiacol, 153  $\mu\text{l}$  peróxido de hidrogênio em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0 e 1  $\mu\text{l}$  do extrato vegetal.

A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30°C, realizando-se leituras de absorvância em comprimento de onda de 470 nm, em 0,5 min e 15,5 min após a adição do extrato. Os resultados foram expressos em unidades de  $\text{PO} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{tecido} \cdot \text{min}^{-1}$ , admitindo-se que 1 unidade de PO equivale ao incremento de absorvância de  $0,001 \cdot \text{min}^{-1}$ .

### **Ensaio para determinação da atividade de $\beta$ -1,3-Glucanases**

A atividade das  $\beta$ -1,3-glucanases nas amostras foi determinada espectrofotometricamente por teste colorimétrico que avalia a glicose liberada da laminarina (substrato), após o uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB), conforme Lever (1972).

A mistura de reação consistiu de 220  $\mu\text{l}$  do tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250  $\mu\text{l}$  da solução do substrato laminarina a 4  $\text{mg mL}^{-1}$  e 30  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal, incubando-se a 45 °C por 1 h. Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL da solução de desenvolvimento de cor composta por 0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB) dissolvidos em 10 mL de HCl 0,5 M e 50 mL de NaOH 0,5 M, sendo em seguida a mistura aquecida a 100 °C por 5 minutos. Reações de cada amostra, adicionadas da solução de desenvolvimento de cor e aquecidas no momento da adição do extrato foram utilizadas como controle. Após resfriamento, as absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 410 nm. A atividade da enzima foi determinada pela diferença entre os valores de absorvância para cada reação após 1 h de incubação e os valores de absorvância da reação controle.

### **Ensaio para determinação da atividade de Fenilalanina amônia-liase (PAL)**

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi quantificada por medida espectrofotométrica a 290 nm, após conversão de L-fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico, monitorada em intervalos definidos entre 0,5 min e 3,5 min após o início da reação a 37°C (adaptado de Pascholati *et al.*, 1986). Uma curva padrão associando absorvância a 290 nm e concentrações conhecidas de ácido *trans*-cinâmico foi preparada previamente. A mistura de reação constituiu-se de 10  $\mu\text{l}$  do extrato foliar e

1000 µl de solução a 0,2% (p/v) de L-fenilalanina. O diferencial entre os valores de absorvância no intervalo de tempo foi calculado e transformado em nmoles de ácido *trans*-cinâmico utilizando-se a equação obtida por ajuste linear da curva padrão. Os resultados foram expressos em nmoles de ácido *trans*-cinâmico.g<sup>-1</sup> tecido.min<sup>-1</sup>.

#### **Ensaio para determinação da atividade de Polifenoloxidasas (PPO)**

A atividade das polifenoloxidasas foi determinada pela oxidação do catecol para quinona, no ensaio preparado com 1 mL de pirocatequina a 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8 e 34 µL do extrato vegetal, incubando-se a mistura a 30°C. As leituras em espectrofotômetro a 420 nm foram realizadas em períodos de 0,5 min, 5,5 min e 10,5 min. A diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para determinação da atividade. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como um incremento de absorvância de 0,001.min<sup>-1</sup> (Duangmal & Apenten, 1999). Os resultados foram expressos em unidades de PPO.10 mg<sup>-1</sup> tecido.min<sup>-1</sup>.

#### **Ensaio para determinação da atividade de Lipoxigenases (LOX)**

A atividade das lipoxigenases foi quantificada em espectrofotômetro em absorvância de 234 nm (Axelrod *et al.*, 1981), detectando-se a formação de ligações duplas conjugadas no hidroperóxido formado, pela ação desta enzima sobre o ácido linoléico (Porta & Rocha-Sosa, 2002), em substrato linoleato de sódio 10 mM, pH 9,0. A reação consistiu de 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20 µl do substrato e 10 µl do extrato vegetal. As amostras foram incubadas em banho-maria a 25°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro em 0,5 min e 10,5 min após o início da reação. A velocidade de formação dos produtos (V) foi calculada pela equação:

$$V = \frac{\Delta A_{234}}{e.d.\Delta t}$$

utilizando o coeficiente de extinção molar (ε) dos hidroperóxidos para o ácido linoléico de 25.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Axelrod *et al.*, 1981), o caminho ótico (d) de 1,0 cm e o tempo de

reação ( $\Delta t$ ). Os resultados finais de atividade enzimática foram expressos em  $\mu\text{M}$  de produto formado. $100 \text{ mg}^{-1}$  tecido. $\text{min}^{-1}$ .

### **Representação dos resultados**

Os resultados das atividades para cada enzima foram expressos em relação ao peso fresco de tecido do material vegetal submetido à extração (Gundlach *et al.*, 1992; Mozzetti *et al.*, 1995; Sharan *et al.*, 1998; Dubery *et al.*, 2000; Stadnik & Buchenauer, 2000).

### **Análise dos resultados**

A análise estatística dos ensaios foi realizada através do programa SAS, versão 8.00, utilizando o proc GLM e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Houve um aumento da concentração de proteínas totais em todos os tratamentos em relação à testemunha, tendo maior acúmulo as plantas submetidas ao tratamento CI (Figura 1).

Não foi observada atividade de glucanases em nenhum tratamento (dados não apresentados). Este resultado era esperado, uma vez que estas enzimas são acumuladas gradativamente em resposta a infecção por patógenos fúngicos, à medida que fragmentos de  $\beta$ -1,3-glucano da parede dos microrganismos são liberados (Mendgen *et al.*, 1985), agindo como eliciadores (Mauch *et al.*, 1984; Albersheim & Darvill, 1985; Kombrink & Hahlbrock, 1986; Kombrink *et al.*, 1988; Yoshikawa & Sugimoto, 1993; Sticher *et al.*, 1997; Klarzynski & Fritig, 2001).

Plantas submetidas ao tratamento CI apresentaram atividade de PO significativamente superior aos demais tratamentos, indicando uma possível resposta de resistência induzida pelo agente de biocontrole, seguido por I e finalmente por A e C, com atividades similares (Figura 2).

Um aumento significativo na atividade da PAL em I, indica que a planta utiliza constitutivamente esta enzima como fator de resistência à infecção pelo patógeno. Porém, esta resposta não foi observada no tratamento CI, também exposto a *P. s. pv. tomato* (Figura 3).

Tem sido demonstrado que a indução da produção de PO constitui um dos primeiros eventos na interação planta-patógeno (Cook *et al.* 1995; Harrison *et al.*, 1995; Chittoor *et al.*, 1997), diretamente relacionado ao fenômeno conhecido como “explosão oxidativa” (Martinez *et al.*, 1998; Wojtaszek, 1997). Este fenômeno contribui para uma rápida produção de espécies reativas de oxigênio (Martinez *et al.*, 1998; Neill *et al.*, 2002), que além de causarem morte celular (Adam *et al.*, 1989), têm atividade antimicrobiana, agindo diretamente sobre o patógeno (Peng & Kuc, 1992; Wu *et al.*, 1995). Assim, pode-se inferir que em CI (Figura 2), as espécies reativas de oxigênio foram capazes de agir com eficiência, rapidamente, contra o patógeno, devido à sua alta concentração, havendo morte de células por resposta de HR, o que talvez não tenha permitido um aumento da atividade da PAL (Figura 3).

Wolfe *et al.* (2000) verificaram em *Arabidopsis thaliana* que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas inoculadas com um isolado de *P. s. pv. tomato*, contendo o gene de avirulência *avr Rpt2*, foi significativamente superior a plantas somente inoculadas com o isolado virulento. Pode-se traçar um paralelo com os resultados aqui encontrados, uma vez que plantas em estado de indução, ao serem expostas ao patógeno, também desencadeiam resposta de resistência com maior intensidade que as não induzidas, podendo também expressar uma maior atividade das PO e, conseqüentemente, maior concentração de espécies reativas de oxigênio. Neste caso, o aumento de atividade de PO (Figura 2) nas plantas submetidas ao tratamento I não teria sido suficiente para conter o patógeno, porém houve eliciação para o aumento da atividade da PAL (Figura 3).

Um fato curioso observado foi a redução da atividade das PPO em I (Figura 4), uma vez que os tratamentos apresentaram resultados inversos à resposta encontrada para PAL (Figura 3). Este evento pode estar ligado a uma redução dos níveis de PPO pelo patógeno, para facilitar o processo de infecção através da produção de toxinas. A toxina coronatina, produzida por *P. s. pv. tomato* (Cuppels *et al.*, 1990) pode contribuir durante os primeiros eventos do processo de patogênese para a supressão da expressão de genes que têm papel na ativação de defesa (Mittal & Davis, 1995).

Embora tenha havido um aumento significativo da atividade das LOX no tratamento CI, uma maior atividade em A, em relação a C e I (Figura 5) não permitiu uma evidência clara do seu envolvimento na resistência a *P. s. pv. tomato*.

A capacidade do isolado UFV-IEA 6 em controlar experimentalmente diversas doenças e o não envolvimento evidente de metabólitos no mecanismo de controle (Halfeld-Vieira *et al.*, 2002a; Halfeld-Vieira *et al.*, 2002b) demonstram indícios de que esta bactéria nativa do filoplano de tomateiro pode ser capaz de induzir resistência, como verificado pelo aumento da atividade de PO. Este parece ser o primeiro caso relatado de uma bactéria não fitopatogênica do filoplano induzindo resistência na mesma cultura de onde foi obtida. Entretanto, outros bioensaios devem ser conduzidos visando explorar novos aspectos que confirmem estas observações, assim como estudar o possível envolvimento de substâncias produzidas pela bactéria no filoplano, que possam ter papel na eliciação de resistência (Zdor & Anderson, 1992; Leeman *et al.*, 1995; Yuen *et al.* 2001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, A.; FARKAS, T.; SOMLYAI, G.; HEVESI, M.; KIRÁLY, Z. Consequence of  $O_2^-$  generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. **Physiological and Molecular Plant Physiology**. v. 34, n. 1, p. 13-26, 1989.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Oligosaccharins. **Scientific American**. v.253, n.3, p. 44-50, 1985.
- ALFENAS, A.C.; BRUNE, W.; OLIVEIRA, J.R.; ALONSO, S.K.; SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Ed. UFV. p. 85-114, 1998.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M. & LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, v. 71, p. 441-451, 1981.
- BARACAT-PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; SANTORO, M.M. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 39, n. 2, p. 91-98, 2001.

- BATE, N.J.; ORR, J.; NI, W.; MEROMI, A.; NADLER-HASSAR, T.; DOERNER, P.W.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J.; ELKIND, Y. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 91, n. 16, p. 7608-7612, 1994.
- BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**. v. 17, n. 1, p. 91-95, 1992.
- BOUNARIO, R.; SCARPONI, L.; FERRARA, M.; SIDOTI, P.; BERTONA, A. Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. **European Journal of Plant Pathology**. v. 108, n. 1, p. 41-49, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**. v. 58, n. 5, p. 743 –750, 2001.
- CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 56, n. 1, p. 13-23, 2000.
- CHITTOOR, J.M.; LEACH, J.E.; WHITE, F.F. Differential Induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 10, n. 7, p. 861-871, 1997.
- COOK, D., DREYER, D., BONNET, D., HOWELL, M., NONY, E., AND VAN DENBOSCH, K. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. **The Plant Cell**. v. 7, n. 1, p. 43-55, 1995.
- CRISTANCHO-ARDILA, M.A.; LEGUIZAMÓN-CAYCEDO, J.E. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. **Cenicafé**. v. 46, n. 3, p. 140-151, 1995.
- CUPPELS, D.A.; MOORE, R.A.; MORRIS, V.L. Construction and use of a nonradioactive DNA hybridization probe for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.1743-1749, 1990.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**. v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

- DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**. v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.
- DUBERY, I.A.; TEODORCZUK, L.G.; LOUW, A.E. Early responses in methyl jasmonate-preconditioned cells toward pathogen-derived elicitors. **Molecular Cell Biology Research Communications**. v. 3, n. 2, p. 105-110, 2000.
- GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 89, n. 6, p. 2389-2393, 1992.
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; ROMEIRO, R.S.; MENDONÇA, H.L.; MIZUBUTI, E.S.G. Eficiência de bactérias do filoplano no controle de doenças foliares do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, suplemento, p. S183-S184, 2002a (Abstract).
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Improperidade do teste de antibiose 'in vitro' na seleção de bactérias do filoplano visando o biocontrole de patógenos foliares do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, suplemento, p. S184, 2002b (Abstract).
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. & KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, 73-80, 1982.
- HARRISON, S. J.; CURTIS, M. D.; MCINTYRE, C. L.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.8, n.3, p. 398-406, 1995.
- HOWLES, P.A.; SEWALT, J.H.; PAIVA, N.L.; ELKIND, Y.; BATE, N.J.; LAMB, C.; DIXON, R.A. Overexpression of L-Phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Physiology**. v. 112, n. 4, p. 1617-1624, 1996.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v.60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KEEN, N.T. & YOSHIKAWA, M.  $\beta$ -1,3-endoglucanases from soybean release elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiology**, v.71, n.3, p.460-465, 1983.
- KLARZYNSKI, O.; FRITIG, B. Stimulation des défenses naturelles des plantes. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III-Sciences de la Vie**. v.324, n. 10, p. 953–963, 2001.

- KOMBRINK, E.; HAHNBROCK, K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. **Plant Physiology**. v. 81, n. 1, p. 216-221, 1986.
- KOMBRINK, E.; SCRÖDER, M; HAHNBROCK, K. Several “pathogenesis-related” proteins in potato are  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 85, p. 782-786, 1988.
- LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBROEK, M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**. v.85, n.9, p. 1021-1027, 1995.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 1, 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, n.2, p.239-247, 2002
- MARTINEZ, C.; MONTILLET, J.L.; BRESSON, E.; AGNEL, J.P.; DAI, G.H.; DANIEL, J.F.; GEIGER, J.P.; NICOLE, M. Apoplastic Peroxidase Generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 11, n. 11, p. 1038-1047, 1998.
- MARTINS, E.M.F.; BERETTA, J.G.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. **Fitopatologia Brasileira**. v. 10, n. 3, p. 521-529, 1985.
- MAUCH, F.; HADWIGER, L.A.; BOLLER, T. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in bean leaves. **The Plant Cell**. v.1, p.447-457, 1984.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B. & BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue: inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, n. 3, p. 936-942, 1988.
- MENDGEN, K.; LANGE, M.; BRETSCHEIDER, K. Quantitative estimation of the surface carbohydrates on the infection structures of rust fungi with enzymes and lectins. **Archives of Microbiology**. v. 140, p. 307-311, 1985.
- MOZZETTI, C.; FERRARIS, L.; TAMIETTI, G.; MATTA, A. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 46, n. 2, p. 95-107, 1995.

- MITTAL, S.; DAVIS, K.R. Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 8, n. 1, p. 165-171, 1995.
- NEIL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5, n. 5, p. 388-395, 2002.
- PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L. & BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**. v. 115, n. 2, p. 165-172, 1986.
- PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* on tobacco leaf discs. **Physiology and Biochemistry**. v.82, p.696-699, 1992.
- PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. **Plant Physiology**. v. 130, n. 1, p. 15-21, 2002.
- PRATS, E.; RUBIALES, D.; JORRÍN, J. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.60, n.3, p.155-162, 2002.
- QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M.A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; FORCHETTI, S.M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A Tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**. v. 122, n. 4, p. 1119-1127, 2000.
- SARMA, A.D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**. v. 49, n. 8, p. 2233-2243, 1998.
- SHARAN, M.; TAGUCHI, G.; GONDA, K.; JOUKE, T.; SHIMOSAKA, M.; HAYASHIDA, N.; OKAZAKI, M. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. **Plant Science**. v. 132, n. 1, p.13-19, 1998.
- STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 57, n. 1, p. 25-34, 2000.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v. 35, p. 235-270, 1997.
- VAN HUYSTEE, R.B. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 38, p. 205-219, 1987.

- VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T. & CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 12, p. 245-264, 1994.
- 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.
- WALLING, L.L. Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends in Plant Science**.v.6, n.10, p. 445-447, 2001.
- WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**. v. 322, p. 681-692, 1997.
- WOLFE, J.; HUTCHEON, C.J.; HIGGINS, V.J.; CAMERON, R.K. A functional gene-for-gene interaction is required for the production of an oxidative burst in response to infection with avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 56, n. 6, p. 253-261, 2000.
- WU, G.; SHORTT, B.; LAWRENCE, E.; LEVINE, E.; FITZSIMMONS, K.; SHAH, D. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **The Plant Cell**. v. 7, n. 9, p. 1357-1368, 1995.
- YOSHIKAWA, M.; SUGIMOTO, K. A fungal suppressor of phytoalexin production competes for the elicitor-receptor binding. **Naturwissenschaften**. v. 80, p. 374-376, 1993.
- YUEN, G.Y.; STEADMAN, J.R.; LINDGREN, D.T.; SCHAFF, D.; JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**. v.20, n.5, p.395-402, 2001.
- ZDOR, R.E.; ANDERSON, A.J. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. **Plant and Soil**. v. 140, n. 1, p. 99-107, 1992.

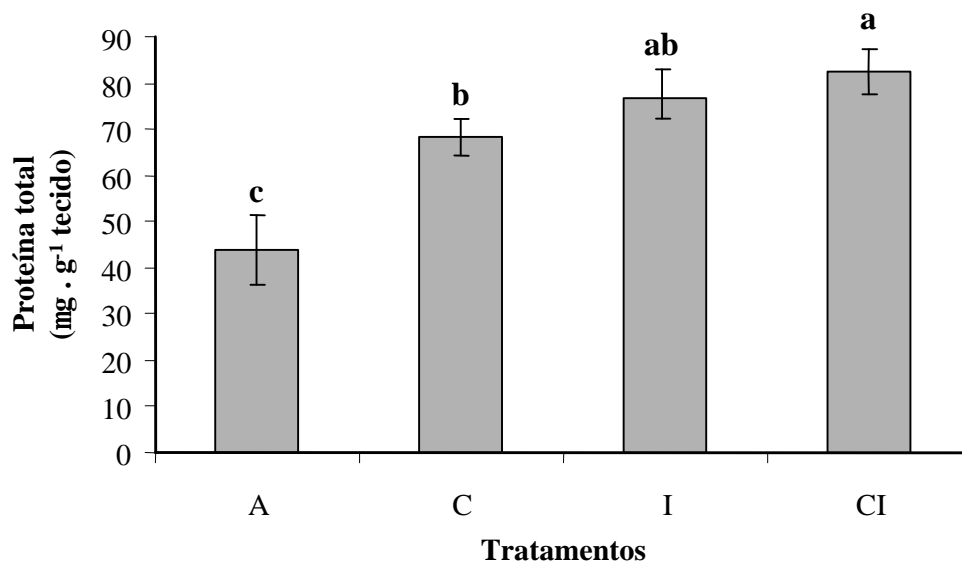


Figura 1 - Concentração de proteínas totais determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: água (A), colonizado (C), inoculado (I), colonizado e inoculado (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

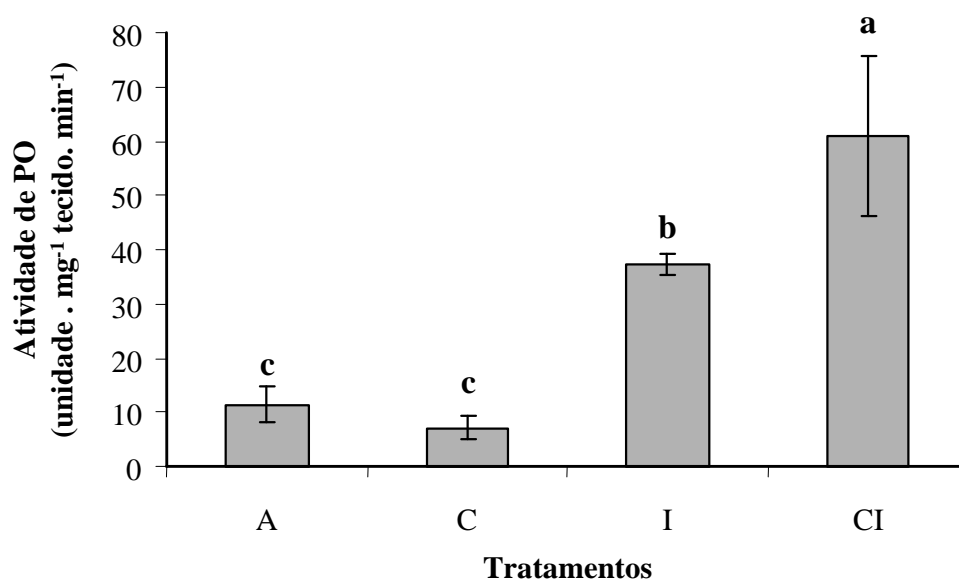


Figura 2 - Atividade de peroxidases (PO) determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: água (A), colonizado (C), inoculado (I), colonizado e inoculado (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

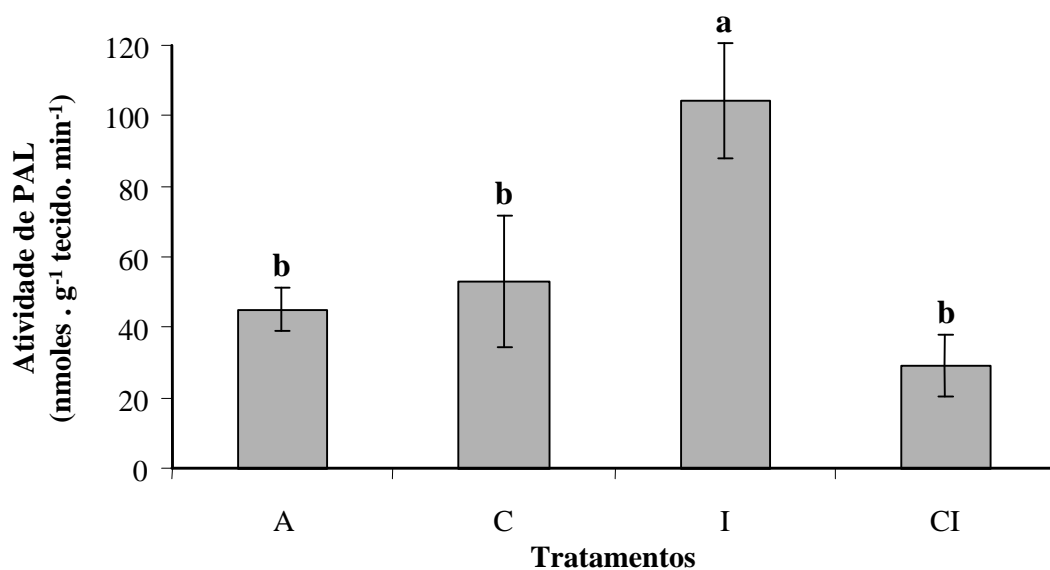


Figura 3 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: água (A), colonizado (C), inoculado (I), colonizado e inoculado (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

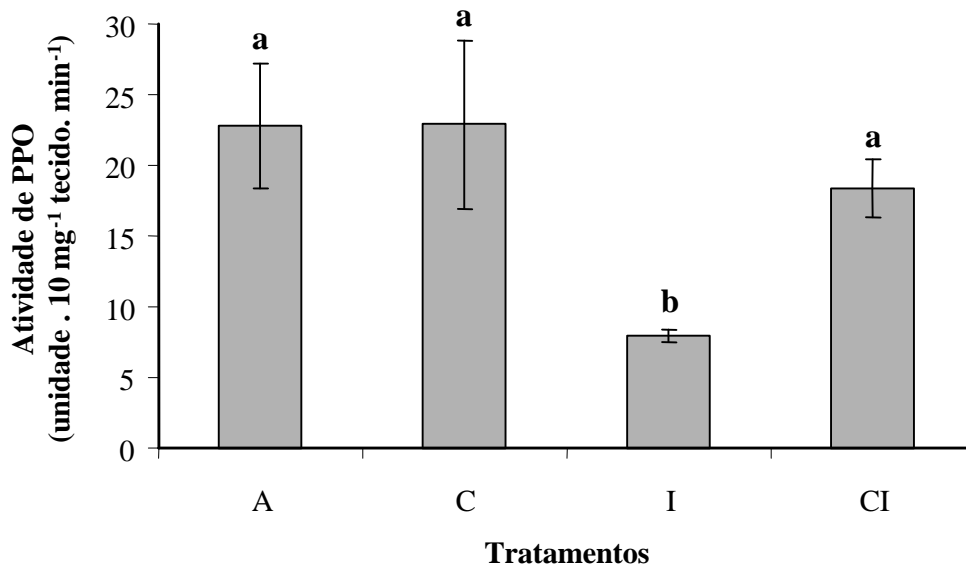


Figura 4 - Atividade de polifenoloxidasas (PPO) determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: água (A), colonizado (C), inoculado (I), colonizado e inoculado (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

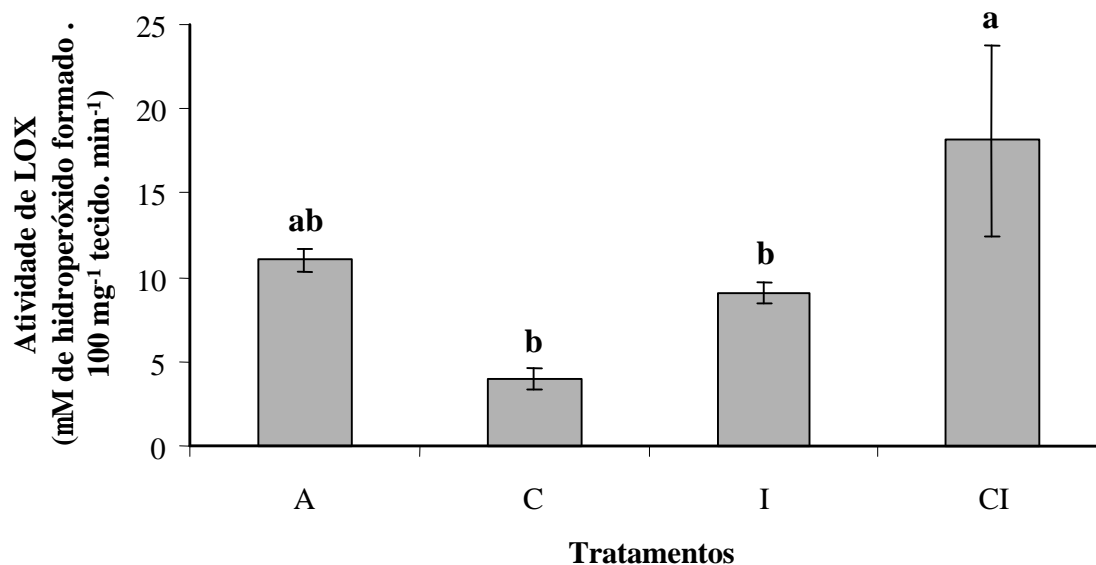


Figura 5 - Atividade de lipoxigenases (LOX) determinada em amostras de plantas submetidas aos tratamentos: água (A), colonizado (C), inoculado (I), colonizado e inoculado (CI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

# EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE TOMATEIRO NO CONTROLE DE DOENÇAS DA PARTE AÉREA DA CULTURA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

## RESUMO

Foi estudada a capacidade de controle da pinta-preta (*Alternaria solani*), requeima (*Phytophthora infestans*) e septoriose (*Septoria lycopersici*), em condições de campo, por duas bactérias do filoplano de tomateiro. Como parâmetros para comparação, foram utilizados o fungicida clorotalonil (1,5 g i.a. L<sup>-1</sup>) e água. Os resultados demonstram que houve redução da intensidade da requeima pelo antagonista UFV-STB 6 de 55% no terço médio e 62% no terço superior da planta, em relação à testemunha. O isolado UFV-IEA 6 foi capaz de reduzir a intensidade da doença somente nas folhas do terço superior, em valores de 55%. Observou-se também, capacidade significativa na redução do percentual de frutos com sintomas de requeima, pelo isolado UFV-STB 6, além de uma tendência em reduzir o progresso da septoriose. Os resultados indicam que as duas bactérias testadas podem vir a ser utilizadas no controle destas doenças, devendo-se desenvolver formulações e serem feitos estudos complementares visando explorar ao máximo seu potencial.

## ABSTRACT

The capacity to control early blight (*Alternaria solani*), late blight (*Phytophthora infestans*) and septoria leaf spot (*Septoria lycopersici*) under field conditions, by the two bacteria was also evaluated and compared with chlorothalonil (1,5 g a. i. L<sup>-1</sup>). Relative to the control the isolate UFV-STB 6 reduced late blight intensity by 55% in middle third and 62% in the upper third of the plants, and also reduced percent fruits with late blight symptoms, besides showing a tendency to reduce progress of septoria leaf spot. The isolate UFV-IEA 6 reduced the disease intensity by about 55%, but only in the upper third of the plant. The results indicate that these two

bacteria can be used in the control of these diseases, if the formulations are developed and complementary studies are done to explore their maximal potential.

## INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das principais hortaliças cultivadas, entretanto diversas doenças são capazes de limitar seu potencial de produção, reduzindo tanto a produtividade quanto a qualidade dos frutos (Lopes & Santos, 1994; Hartman & Huang, 1995). Dentre as diversas estratégias de controle, a utilização de agentes de biocontrole pode vir a contribuir como um importante componente do manejo integrado (van Lenteren, 2000).

No processo de prospecção de potenciais antagonistas, testes em campo constituem uma das principais etapas do processo de seleção, já que variações de umidade, temperatura, radiação solar, dentre outros, podem comprometer a eficiência dos agentes de biocontrole, por afetar a sua capacidade de sobrevivência (Andrews & Hirano, 1991; Wilson *et al.*, 1999). Slesman & Leben (1976) trabalhando com bactérias antagonistas, a *Bipolaris maydis* em milho, observaram que 96 a 99% das células de um isolado, capaz de reduzir em 86 a 100% o número de lesões foliares em condições ideais de ambiente, foram incapazes de sobreviver após 1 h em condições de baixa umidade. Estes aspectos fazem com que o controle biológico seja mais aplicado a cultivos protegidos, onde se pode controlar melhor as condições de ambiente (Paulitz & Bélanger, 2001).

Para doenças muito destrutivas como a requeima (Jones *et al.*, 1991; Hartman & Huang, 1995; Erwin & Ribeiro, 1996), causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, a aplicabilidade do controle biológico é um dos maiores desafios. Porém, esta alternativa pode vir a ser um componente a mais no manejo integrado pelo aumento da eficiência do controle químico (Minuto *et al.*, 1995), uma vez que muitos fungicidas não têm proporcionado níveis satisfatórios de controle (Silva *et al.*, 2000). Outra estratégia seria sua utilização apenas em situações de ambiente pouco favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, como proposto para o controle do mofo-cinzento (*Botrytis cinerea*) em tomateiro e pepino (Shtienberg & Elad, 1997). No Brasil, o desenvolvimento de sistemas de previsão da requeima, da pinta preta, causada por

*Alternaria solani* Sorauer e septoriose por *Septoria lycopersici* Speg. (Barreto & Scaloppi, 2000) pode tornar viável a adoção desta estratégia. Para a mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 e da mancha-bacteriana pequena por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978, esta alternativa teria grande potencial de aplicação, pois as bactérias podem apresentar resistência a fungicidas cúpricos (Marco & Stall, 1983; Bender & Cooskey, 1986; Pernezny *et al.*, 1995; Bouzar *et al.*, 1999, Cuppels, 1999; Wilson *et al.*, 2002).

Este trabalho visou verificar a eficiência, em campo, de duas bactérias obtidas do filoplano de tomateiro, previamente selecionadas em casa-de-vegetação, para o controle das doenças causadas por *A. solani*, *P. infestans* e *S. lycopersici*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Manejo da cultura

O experimento foi realizado no período de 14 de agosto a 17 de outubro de 2002 no sítio Criciúma, próximo ao campus da Universidade Federal de Viçosa-MG. Mudanças de tomateiro cv. Santa Clara foram produzidas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax<sup>®</sup> e transplantadas para o campo 30 dias após o semeio. O espaçamento foi de 0,8 m entre fileiras e 0,5 m entre plantas. As adubações foram realizadas no momento do transplante e vinte e cinco dias após, de acordo com análise do solo. As plantas foram conduzidas em haste única e tutoradas com estacas de bambu, realizando-se periodicamente tratos culturais como desbrotas e amarração das plantas.

### Tratamentos e delineamento experimental

Foram avaliados quatro tratamentos, constituídos por duas bactérias antagonistas, UFV-IEA 6 e UFV-STB 6, clorotalonil (1,5 g i.a. L<sup>-1</sup>) e água (testemunha), aplicados semanalmente com pulverizador costal. Para o preparo das suspensões dos antagonistas UFV-IEA 6 e UFV-STB 6, colônias foram semeadas por espalhamento, em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e incubadas por 24 h a 25°C.

Suspensões de células de cada bactéria foram preparadas em água e ajustadas a  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias por mL. As pulverizações foram iniciadas no dia seguinte após o transplântio.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com cinco repetições. Cada parcela foi composta por três fileiras com seis plantas cada, considerando-se parcela útil as seis plantas contidas na fileira central.

### **Avaliações**

No decorrer do experimento, avaliou-se a intensidade das doenças que incidiram naturalmente na cultura. A severidade de cada doença foi avaliada periodicamente, quantificando-se a percentagem de área foliar lesionada no terço superior, médio e inferior de cada planta, separadamente. Para pinta-preta (*A. solani*) utilizou-se a escala diagramática descrita por Boff *et al.*, (1991) e para septoriose (*S. lycopersici*) a escala adaptada por Moretto *et al.*, 1993. Para requeima (*P. infestans*) realizou-se avaliação visualmente por treinamento prévio, com o programa Severity Pro v. 1.0 (Nutter Jr., 1997). As áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), foram calculadas para cada terço da planta, de acordo com Campbell & Madden (1990).

A produção foi avaliada por meio de pesagem dos frutos do primeiro cacho, colhidos separadamente em cada planta, 64 dias após o transplântio. Avaliou-se o número e peso de frutos por planta e o número de frutos com sintomas de requeima por cacho.

### **Análise dos dados**

A análise estatística dos ensaios foi realizada através do programa SAS, versão 8.00, utilizando o proc GLM e teste da diferença mínima significativa protegido (Fisher-LSD) a 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na variável AACPD, clorotalonil reduziu a intensidade da requeima, causada por *P. infestans*, em relação aos demais tratamentos (Figura 1 e 2). O fungicida foi também capaz de atrasar o progresso da doença, considerando as avaliações de severidade por planta (Figura 3). Dentre os agentes de biocontrole, o antagonista UFV-STB 6 reduziu em 55% a intensidade da doença no terço médio e em 62% no terço superior da planta, enquanto UFV-IEA 6 teve resultado significativo somente no terço superior, com redução da intensidade da requeima em 55%. Neste terço houve menor intensidade de doença, quando comparado com os demais. Este fato está provavelmente relacionado a um maior grau de resistência em folíolos mais jovens (Mills, 1940; Enkerli *et al.*, 1993) e possivelmente por estarem sujeitos à maior ventilação e menor umidade, condições menos propícias para o desenvolvimento do patógeno (Jones *et al.*, 1991). Desta forma, os antagonistas podem contribuir mais efetivamente na redução da severidade da requeima, em plantas mais resistentes e em situações com menor risco da ocorrência de epidemias.

Em condições de ambiente pouco favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, os antagonistas podem vir a ser utilizados como alternativa de controle, se adequando a estratégias de regimes de pulverização baseadas em sistemas de previsão. Shtienberg & Elad (1997) utilizaram um sistema de alternância de aplicação de *Trichoderma harzianum* e fungicidas, no controle do mofo-cinzento (*B. cinerea*) em tomateiro e pepino. Baseando-se em condições de ambiente, optava-se entre o fungicida ou o agente de biocontrole. Foi verificado que nos tratamentos onde houve alternância entre aplicação de fungicidas e *T. harzianum*, o controle foi significativamente mais eficiente. A mesma estratégia poderia ser utilizada para o controle da requeima, associando-se aplicações de fungicidas registrados para o tomateiro e os agentes de biocontrole UFV-IEA 6 e UFV-STB 6.

O desenvolvimento de sistemas de previsão da requeima em tomateiro, adequados para as condições brasileiras (Barreto & Scaloppi, 2000), da mesma forma que para batateira (Costa *et al.*, 2002), poderão viabilizar a adoção desta estratégia, reduzindo a frequência da aplicação de fungicidas.

Considerando o percentual de frutos com sintomas por planta, o controle com fungicida foi mais eficiente, seguido pelo isolado UFV-STB 6 (Figura 4). O antagonista UFV-IEA 6 não foi capaz de controlar a requeima em frutos, com resultado similar a

testemunha. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, para o peso e o número de frutos por planta.

Houve relação entre eficiência de controle da doença nas folhas dos diferentes terços das plantas e nos frutos do primeiro cacho, localizados na base da planta. Os tratamentos que proporcionaram melhor controle da requeima em folhas dos terços médio e inferior foram os que apresentaram o menor número de frutos com sintomas. Estes dados indicam haver a necessidade de uma alta densidade de inóculo em locais próximos aos frutos para que ocorra infecção. Também pode ser uma evidência de que o antagonista UFV-STB 6 seja capaz de controlar a doença tanto em folhas como em frutos.

Embora tenha havido epidemia da septoriose (*S. lycopersici*), a doença foi mais severa apenas nos blocos III e V, o que não permitiu a análise estatística dos dados. Entretanto, houve uma tendência na redução do progresso da doença, em relação a testemunha, por todos os tratamentos no bloco V (Figura 5). Nos demais blocos, as pulverizações com clorotalonil e o antagonista UFV-STB 6 reduziram a severidade da doença. Estas tendências sugerem que o isolado UFV-STB 6 pode exercer algum efeito no controle da septoriose. Para *A. solani*, apenas em algumas plantas isoladas observaram-se sintomas da pinta-preta, não havendo epidemia no campo.

Os resultados sugerem que o antagonista UFV-STB 6 teve efeito no controle da requeima, sendo o mais promissor. A capacidade do isolado UFV-IEA 6 controlar a doença em folhas do terço superior das plantas indica que este, possivelmente, tem algum efeito sobre o patógeno.

Estudos de sobrevivência dos agentes de biocontrole em condições de campo e da frequência de aplicação mais adequada devem ser conduzidos, já que influenciam diretamente na capacidade de controle (Krishnamurthy & Gnanamanickam, 1998). A interação destes isolados com a comunidade microbiana nativa, também deve ser considerada, pois diversos fatores como idade de folhas e ambiente, são fatores que estão relacionados à sua composição e dinâmica populacional (Périssol *et al.*, 1993; Jacques *et al.*, 1995), o que pode interferir no desempenho dos antagonistas. Outro fator importante é o desenvolvimento de formulações que permitam otimizar a eficiência dos antagonistas, assim como expressar todo seu potencial no controle das doenças (Sabaratnam & Traquair, 2002).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. 501 p.
- BARRETO, M.; SCALOPPI, E.A.G. **Sistemas de Previsão de Doenças de Hortaliças**. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) Manejo integrado-doenças, pragas e plantas daninhas. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, p.169-186, 2000.
- BENDER, C.L.; COOKSEY, D.A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **Journal of Bacteriology**. v. 165, n. 2, p. 534-541, 1986.
- BOFF, P.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. Escalas para avaliação de severidade da mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta-preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 16, n. 4, p. 280-283, 1991.
- BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUJIN, F.J.; JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the caribbean and central america: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**. v. 89, n. 4, p. 328-335, 1999.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Willey & Sons. 1990. 532 p.
- COSTA, R.V.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MIZUBUTI, E.S.G. Previsão da requeima da batateira. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, n. 4, p. 349-354, 2002.
- CUPPELS, D.A. Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants. **Plant Disease**. v. 83, n. 8, p. 759-764, 1999.
- ENKERLI, J.; GISI, U.; MÖSINGER, E. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 43, n. 3, p. 161-171, 1993.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. St. Paul: APS press, 1996. 562 p.
- HARTMAN, G.L.; HUANG, Y.H. Characteristics of *Phytophthora infestans* isolates and development of late blight on tomato in Taiwan. **Plant Disease**, v.79, n.8, p.849-852, 1995.
- JACQUES, M.A.; KINKEL, L.L.; MORRIS, C.E. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 3, p. 899-960, 1995.

- JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. (Eds.) **Compendium of Tomato Diseases**. St. Paul: APS press, 1991. 100 p.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v.60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S.S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: evaluation of a marker gene and formulations. **Biological Control**. v. 13, n. 3, p. 158-165, 1998.
- LOPES, C.A.; SANTOS, R.M. **Doenças do Tomateiro**. Embrapa: Brasília, 1994. 67 p.
- MARCO, G.M.; STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**. v. 67, n. 7, p. 779-781, 1983.
- MILLS, W.R. *Phytophthora infestans* on tomato. **Phytopathology**. v.30, n.10, p.830-839, 1940.
- MINUTO, A.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological control and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**. v. 14, n. 3, p. 221-226, 1995.
- MORETTO, K.C.K.; NAKAMURA, K.; BARRETO, M. Comportamento de algumas cultivares de tomateiro quanto à resistência à septoriose (*Septoria lycopersici*) avaliado através de alguns componentes monocíclicos. **Summa Phytopathologica**. v. 19, n. 3-4, p. 161-164, 1993.
- NUTTER JR., F.W. **Disease Severity Assessment Training**. In: FRANCI, L.J.; NEHER, D.A. (Eds.) Exercises in plant disease epidemiology. St.Paul: APS Press, p. 1-7, 1997.
- PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**. v. 39, p. 103-33, 2001.
- PÉRISSOL, C.; ROUX, M.; PETIT, J.L. Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces. **European Journal of Soil Biology**. v. 29, n. 3-4, p. 167-176, 1993.
- PERNEZNY, K.; KŮDELA, V.; KOKOŠ KOVÁ, B.; HLÁDKÁ, I. Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains **Crop Protection** v. 14, n. 4, p. 267-270, 1995.
- SABARATNAM, S.; TRAQUAIR, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**. v. 23, n. 3, p. 245-253, 2002.

- SHTIENBERG, D.; ELAD, Y. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**. v. 87, n. 3, p. 332-340, 1997.
- SILVA, M.B.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Controle químico da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 25, n. 3, p. 566, 2000.
- SLEESMAN, J.P.; LEBEN, C. Microbial antagonists of *Bipolaris maydis*. **Phytopathology**. v. 66, n. 10, p. 1214-1218, 1976.
- VAN LENTEREN, J.C. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? **Crop Protection**. v. 19, n. 6, p. 375-384, 2000.
- WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 4, p. 1435-1443, 1999.
- WILSON, M.; CAMPBELL, H.L.; JI, P.; JONES, J.B.; CUPPELS, D.A. Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in north america. **Phytopathology**. v. 92, n. 12, p. 1284-1292, 2002.

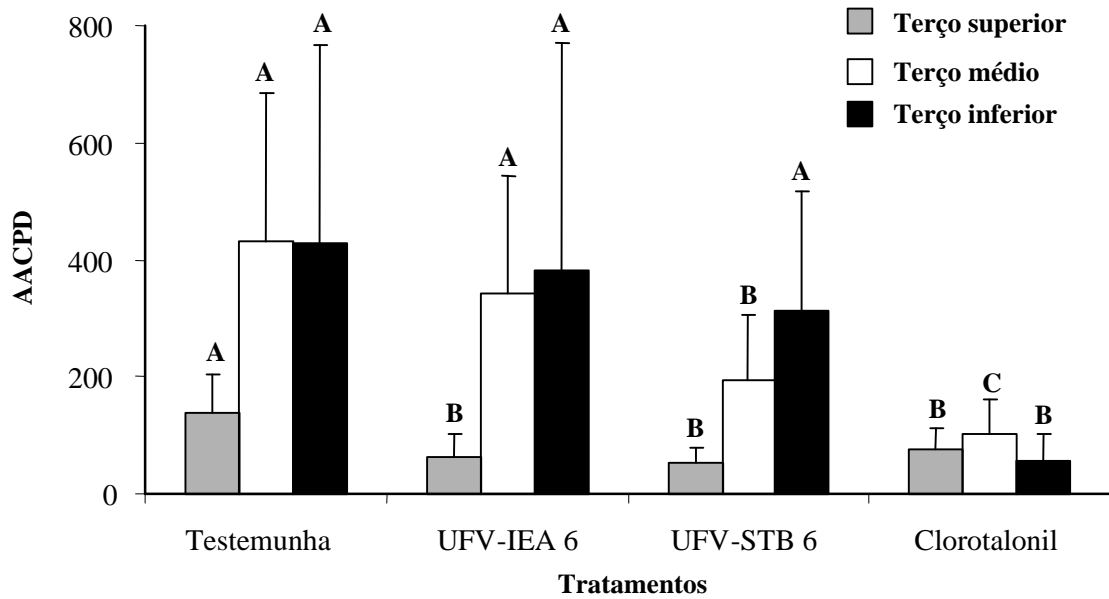


Figura 1 - Comparação de diferentes tratamentos no controle da requeima (*P. infestans*), de acordo com a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), considerando as avaliações efetuadas nos terços superior, médio e inferior das plantas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Fisher-LSD a 5%. Os valores apresentados correspondem à média e as barras representam o desvio padrão.

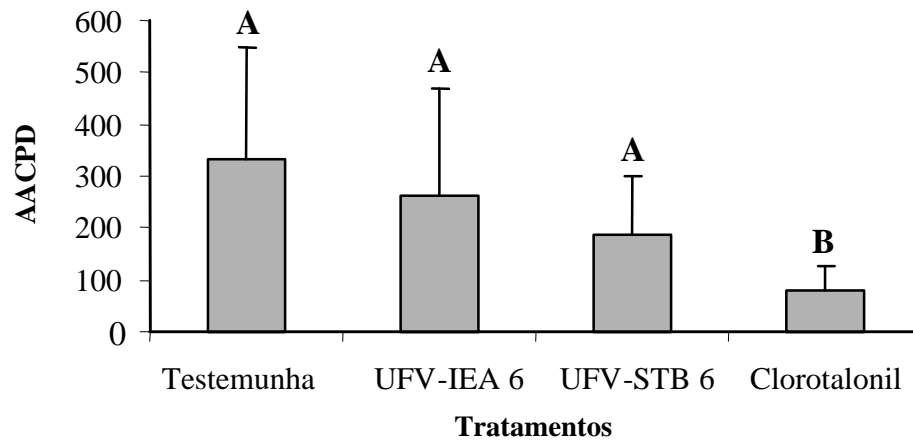


Figura 2 - Comparação de diferentes tratamentos no controle da requeima (*P. infestans*), de acordo com a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), considerando as avaliações efetuadas em cada planta. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Fisher-LSD a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

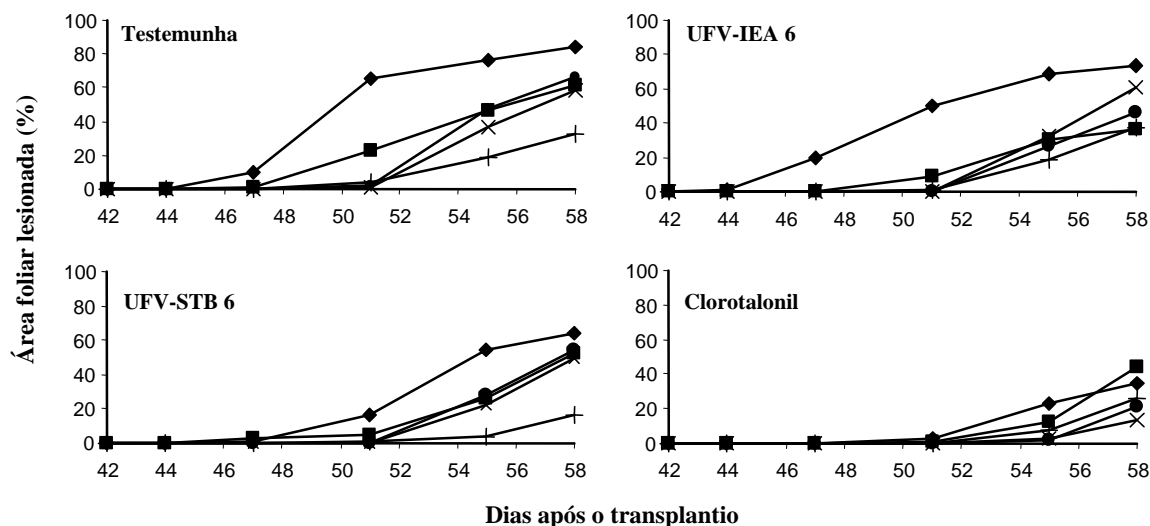


Figura 3 - Progresso da requeima (*P. infestans*) em plantas submetidas a diferentes tratamentos. As curvas de progresso representam os dados médios por planta, onde:  $\blacklozenge$ =Bloco I;  $\bullet$ = Bloco II;  $\blacksquare$ = Bloco III;  $\times$  = Bloco IV e  $+$ = Bloco V.

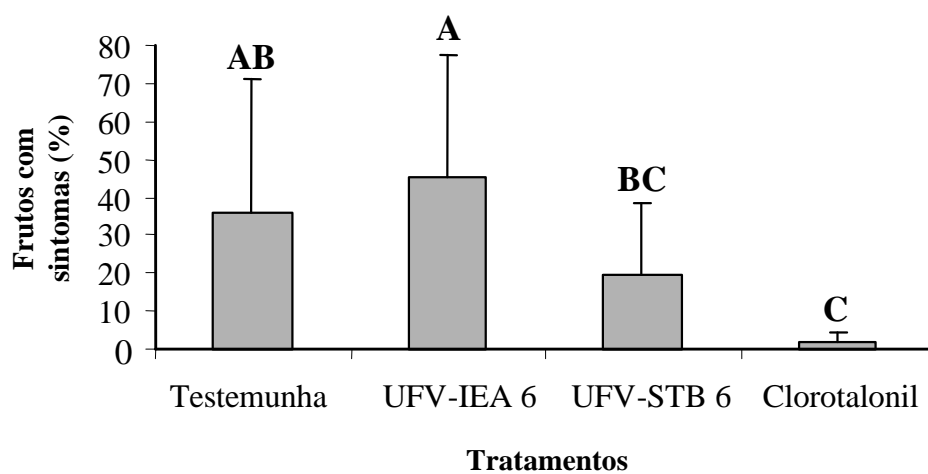


Figura 4 - Comparação de diferentes tratamentos no controle da requeima (*P. infestans*), de acordo com o percentual de frutos com sintomas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Fisher-LSD a 5%. Os valores apresentados correspondem às médias e as barras representam o desvio padrão.

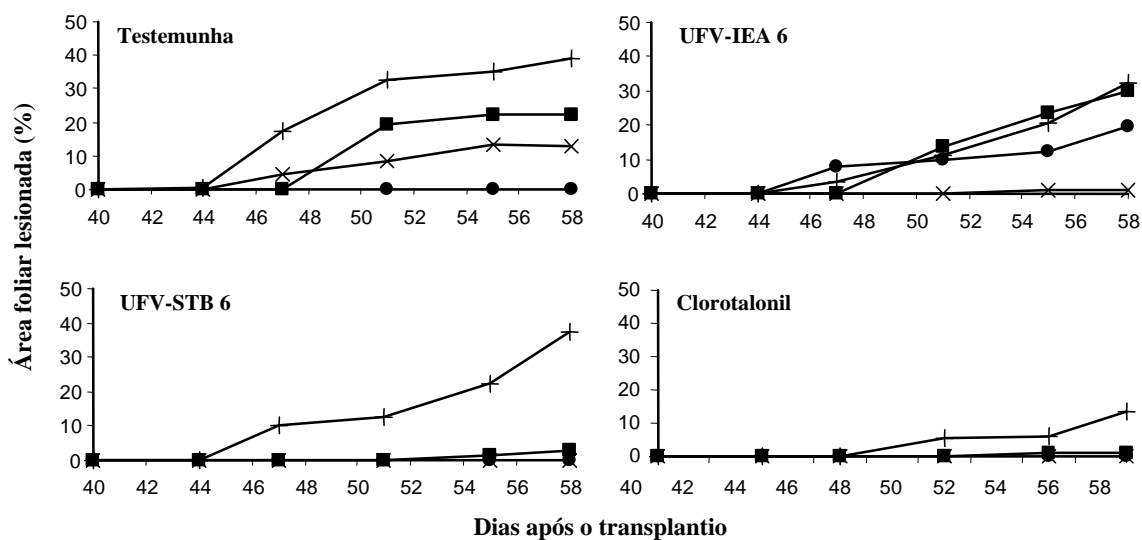


Figura 5 - Progresso da septoriose (*S. lycopersici*) em plantas submetidas a diferentes tratamentos. As curvas de progresso representam os dados médios por planta, onde: ● = Bloco II; ■ = Bloco III; x = Bloco IV e + = Bloco V. A curva de progresso referente ao Bloco I não foi representada, uma vez que não houve doença.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em folíolos mais jovens, os métodos de isolamento que visam obter bactérias da população total e da superfície do filoplano, foram os que permitiram obter a maioria dos antagonistas. O único obtido de folíolos mais velhos foi proveniente da população capaz de habitar sítios protegidos do filoplano e/ou resistir a fatores de estresse. Não se observou relação entre características biológicas dos antagonistas e dos patógenos testados.

Nos testes de antibiose com os antagonistas selecionados, o isolado UFV-STB 6 foi capaz de produzir compostos voláteis e inibir a germinação de cistos de *Phytophthora infestans*, o que deve estar envolvido no controle da requeima. O isolado UFV-IEA 6 produziu quitinase, havendo também uma tendência em reduzir a taxa de crescimento de *Alternaria solani* por compostos voláteis. Ficou demonstrado que os testes de antibiose *in vitro* são inadequados como critério para seleção de agentes de biocontrole do filoplano de tomateiro.

A caracterização dos melhores antagonistas demonstrou que três são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, e uma Gram-negativa, pleiomórfica. Dentre as Gram-positivas todas são anaeróbias facultativas e uma forma endósporos. Nenhum antagonista foi capaz de causar reação de hipersensibilidade (HR) em fumo e produzir pigmento fluorescente *in vitro*. Os períodos de geração calculados a partir das curvas de crescimento revelaram que três isolados são capazes de se multiplicar rapidamente em meio de cultura, o que é uma característica desejável.

Os resultados obtidos a partir dos antibiogramas, mostraram que existem antibióticos que podem ser utilizados para elaboração de meios semi-seletivos, adequados a cada antagonista e os testes de compatibilidade com antibióticos e fungicidas utilizados na cultura do tomateiro revelaram que os antagonistas podem ser expostos aos fungicidas benomyl, enxofre, dimetomorph e tiofanato-metílico. Foi verificada a inadequação de se utilizarem compostos antimicrobianos em meio de cultura para isolamento de agentes bacterianos de controle biológico, uma vez que os antagonistas selecionados foram sensíveis à grande maioria dos produtos testados.

Os testes com as enzimas indicadoras do estado de indução de resistência,  $\beta$ -1,3-glucanases, Fenilalanina amônia-liase (PAL), Peroxidases (PO), Polifenoloxidasas (PPO) e Lipoxigenases (LOX), indicaram que o isolado UFV-IEA 6 foi capaz de promover aumento significativo na atividade das PO, evidenciando a possibilidade do antagonista agir como indutor de resistência. Esse parece ser o primeiro caso que se tem conhecimento de uma bactéria não fitopatogênica do filoplano induzindo resistência na mesma cultura de onde foi obtida.

Os testes com os dois antagonistas em condições de campo, demonstraram que UFV-STB 6 foi o mais eficiente, em reduzir a severidade da requeima nos terços médio e superior das plantas, enquanto UFV-IEA 6, somente no terço superior. Houve tendência na redução do progresso da septoriose por UFV-STB 6 e capacidade em diminuir o número de frutos com sintomas de requeima. Os resultados indicam haver um grande potencial de uso dos agentes de biocontrole selecionados para o controle das doenças da parte aérea de tomateiro, estudadas.