

RENATO CARRER FILHO

**ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE
DOENÇAS E COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002**

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

T

C314a
2002

Carrer Filho, Renato, 1975-

Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro / Renato Carrer Filho. – Viçosa : UFV, 2002.
78 p. : il.

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

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle biológico. 2. Tomate - Resistência a doenças e pragas - Indução. 3. Tomate - Promotores de crescimento. 4. Actinomycetales no controle biológico de pragas. 5. Fungos fitopatogênicos - Controle. 6. Bactérias fitopatogênicas - Controle. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.64293

CDD 20.ed. 635.64293

RENATO CARRER FILHO

**ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE
DOENÇAS E COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO**

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

APROVADA: 21 de Junho de 2002

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Conselheiro)

Prof. Ulisses Gomes Batista
(Conselheiro)

Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya

Prof. Paulo César Rezende Fontes

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e luz me dada em mais uma etapa de minha vida.

Aos meus pais, Renato Carrer e Ana Maria de Castro Carrer, por tornar-se possível a minha existência e a toda minha Família por me incentivarem sempre.

Ao ilustre professor Reginaldo da Silva Romeiro, meu orientador, pelo acolhimento, pelo auxílio, pela amizade, pela paciência e, principalmente, por acreditar na potencialidade das pessoas.

Aos professores Leandro Grassi de Freitas, Ulisses Gomes Batista e José Rogério de Oliveira, pelo apoio constante e perseverante.

A toda equipe do Laboratório de Bacteriologia e de Controle Biológico de Plantas, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelas sugestões para aperfeiçoamento das idéias e por tornarem mais prazerosa a execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Epidemiologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, pela ajuda sempre que necessário.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos decorrentes.

À técnica de laboratório, Maria Sueli Cardoso Oliveira, sempre disposta a ajudar e a corrigir atos falhos.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida.

Aos integrantes da Ex-República Kroca, Pathanka e da atual República dos Arigós, pela amizade plena e sincera.

A todos os meus amigos, presentes e ausentes, encarnados e desencarnados, que nunca serão esquecidos.

BIOGRAFIA

Renato Carrer Filho, filho de Ana Maria de Castro Carrer e Renato Carrer, nasceu em Goiânia, Goiás, no dia 21 de abril de 1975.

Em 1993, ingressou, na Universidade Federal de Viçosa, no curso de Agronomia.

Em março de 2000, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na mesma instituição, defendendo tese em junho de 2002.

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
ARTIGO 1º:	
SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS ACTINOMICETOS ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS DA CULTURA DO TOMATEIRO.....	5
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Aspectos morfológicos, fisiológicos e sistemáticos dos organismos actinomicetos.....	8
1.2. Actinomicetos como potenciais agentes de biocontrole.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Isolamento de actinomicetos.....	11
2.2. Manutenção e cultivo dos patógenos.....	12
2.3. Cultivo e preservação dos actinomicetos.....	12
2.4. Produção de substâncias antimicrobianas “in vitro”	13
2.5. Bioensaio de colonização de raízes	13
2.6. Seleção massal dos actinomicetos, como agentes de biocontrole com o uso de patógenos desafiante, em casa de vegetação.....	13
2.6.1. Preparo do inóculo, inoculação e avaliação	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1. Isolamento de actinomicetos.....	15
3.2. Teste de colonização de raízes e de antibiose.....	16
3.3. Seleção massal dos actinomicetos em casa de vegetação pelo uso de dois patógenos desafiante	17
3.4. Actinomicetos pré-selecionados como promotores de crescimento de plantas.....	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

ARTIGO 2º:

AMPLITUDE DA EFETIVIDADE DO ACTINOMICETO SELECIONADO COMO AGENTE DE BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES DO TOMATEIRO	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
1.1. Indução de resistência sistêmica a patógenos em plantas mediada por rizobactérias.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Investigações sobre a amplitude e a efetividade do antagonista selecionado	33
2.1.1. Condições do ensaio	33
2.2. Cultivo, preparo do inóculo e inoculação dos patógenos desafiantes ...	33
2.2.1. <i>Corynespora cassicola</i>	33
2.2.2. <i>Stemphylium solani</i>	34
2.2.3. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	35
2.2.4. <i>Ralstonia solanacearum</i>	35
2.3. Espectro de atividade “in vitro” do actinomiceto selecionado contra patógenos da cultura.....	36
2.3.1. Inibição de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos	36
2.3.2. Inibição na germinação de esporos	37
2.3.3. Inibição “in vitro” da liberação de zoósporos de <i>Phytophthora infestans</i>	37
2.3.4. Inibição de crescimento de fitobacteroses “in vitro”	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Amplitude de efetividade do actinomiceto selecionado	39
3.2. Da eficiência do antagonista selecionado “in vitro”	40
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ARTIGO 3º:

ACTINOMICETOS COMO POSSÍVEIS AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATEIRO.....	48
RESUMO	48

ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Avaliação dos actinomicetos como prováveis agentes promotores de crescimento de plantas de tomateiro	52
2.1.1. Altura de plantas e número de folhas e de folíolos por planta.....	53
2.1.2. Peso das matérias fresca e seca.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ARTIGO 4º:	
ACTINOMICETOS PRÉ-SELECIONADOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE E COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....	59
RESUMO	59
ABSTRACT	60
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1. Condições do ensaio	64
2.2. Condições de manejo.....	66
2.3. Quantificação das doenças.....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
RESUMO E CONCLUSÕES.....	77

RESUMO

CARRER FILHO, Renato, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2002. **Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: Leandro Grassi de Freitas e Ulisses Gomes Batista.

Cento e dezessete actinomicetos, sendo 96 obtidos de diferentes amostras de rizosfera e rizoplano de tomateiro e 21 culturas pré-selecionadas por Moura (1996), pela ação contra *Ralstonia solanacearum*, foram avaliados no controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Alternaria solani* através da microbiolização de sementes de tomateiro (Santa Cruz 'Kada'), seguindo-se o plantio em solo não-tratado e inoculação com os patógenos. A seleção massal, realizada em casa de vegetação, permitiu selecionar, pela contagem do número de lesões, o antagonista mais promissor (RD-01). Paralelamente, foram conduzidos testes de colonização de raízes de tomateiro em tubos contendo ágar-água, não inclinados, e testes de antibiose com os 117 antagonistas contra os patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Alternaria solani*, pelo método da sobre-camada. Cerca de 88% dos antagonistas não tiveram nenhum efeito inibitório contra os patógenos testados apesar de 70% destes terem sido capazes de colonizar raízes em condições gnotobióticas. Em testes para o controle de *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium solani*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* em casa de vegetação, o isolado RD-01 demonstrou incapacidade em reduzir sintomas incitados pelo patógeno de solo, *Ralstonia solanacearum*, mas apresentou potencial como agente de biocontrole dos patógenos foliares. Através de um ensaio de promoção de crescimento, realizado em casa de vegetação com os cento e dezessete isolados, pode-se concluir a inexistência de uma relação entre o efeito de promoção de crescimento vegetal para os isolados testados com os resultados de biocontrole observados em experimento anterior. Em experimento de campo para o controle de *Phytophthora infestans* e *Alternaria*

solani, dois actinomicetos pré-selecionados (RD-01 e SON-17) foram aplicados através da microbiolização de sementes de tomateiro e pela colonização do filoplano, respectivamente. Apesar de o controle químico ter sido mais efetivo que os actinomicetos, estes revelaram sua potencialidade como medida passível de utilização em procedimentos de manejo integrado, a qual precisa ser mais explorada.

ABSTRACT

CARRER FILHO, Renato, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June 2002.

Actinomycetes as agents for the biocontrol of diseases and as promoters of tomato plant growth. Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee Members: Leandro Grassi de Freitas and Ulisses Gomes Batista.

One hundred and seventeen actinomycetes were used in the microbiolization of tomato seeds, followed by the sowing in non-treated soil. From these, 96 were isolated from samples of tomato rizosphere, and 21 cultures had been pre-selected by Moura (1996) for their action against *Ralstonia solanacearum*. At the same time, root colonization tests with tomato grown in test tubes containing water-agar and antibiotics tests were conducted with the antagonists against the pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Alternaria solani*. Nearly 88% of the antagonists had no inhibitory effect against the tested pathogens despite 70% of these had been able to colonize the roots in gnotobiotic conditions. Mass selection, to control *P. s.* pv. *tomato* and *A. solani*, allowed the selection of the most promising antagonist (RD-01), though the reduction of the number of lesions. In a greenhouse test for the control of *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium solani*, *X. c.* pv. *vesicatoria* e *R. solanacearum*, the isolate RD-01 was unable to reduce symptoms incited by the soilborne pathogen, *R. solanacearum*, but presented potential as biocontrol agent of the foliar pathogens. A greenhouse essay was conducted to evaluate the plant-growth promotion by the 117 rhizobacteria, and no correlation could be observed between the effect of growth promotion and the biocontrol effect observed in a previous experiment. In a field experiment to control *Phytophthora infestans* and *A. solani*, two pre-selected actinomycetes (RD-01 e SON-17) were applied through tomato seed microbiolization and phylloplan colonization, respectively. Even though the chemical control was more effective than the actinomycetes, these showed their potential of use in integrated disease management, which needs to be more explored.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma solanácea que se tornou bastante proeminente e popular no século passado, não só pelo agradável paladar, mas também por ser uma rica fonte de aminoácidos, ácidos orgânicos, vitamina C e considerável quantidade de vitaminas B e D (Anderlini, 1982). Porém esta cultura é uma das que mais demanda o uso de defensivos agrícolas durante o cultivo.

A cultura do tomateiro está sujeita a várias doenças e, quando nenhuma medida fitossanitária é adotada, estas são responsáveis por perdas no potencial produtivo, tornando-se um fator limitante à produção (Jones *et al.*, 1991). Para alcançar a maximização dos resultados, muitos métodos de controle têm sido empregados, dentre eles o cultural, o genético, o físico e o químico (Zambolim & Vale, 1997).

O controle químico está sendo uma das principais medidas utilizadas para minimizar o ataque de patógenos durante o ciclo da cultura. Aplicações freqüentes desses produtos em larga escala são responsáveis pelo surgimento de populações de patógenos resistentes e pelo efeito destes sobre organismos não-alvo, acarretando a diminuição de populações de microrganismos benéficos, reduzindo a biodiversidade microbiana e atenuando o desequilíbrio ecológico (Mello & Azevedo, 2000). Isso, além de onerar o custo de produção, causa danos ao meio ambiente e coloca em risco a saúde humana, tanto do produtor quanto do consumidor (Barreto & Scaloppi, 2000).

A preocupação com o uso desses produtos tem incentivado recentemente a utilização do consórcio produção/preservação do meio ambiente a favor da produtividade, consolidando a utilização racional de insumos e o manejo da biota circundante (Fonseca de Souza, 2001), objetivando a diminuição da dependência que os sistemas de produção agrícola têm dos produtos químicos, aumentando a importância dos processos biológicos na reciclagem de nutrientes e no controle biológico de pragas e doenças de plantas. Esses processos são, em sua maioria,

mediados e dependentes da ação microbiana em solos, águas e até em tecidos de plantas (Atlas & Bartha, 1997).

Os altos custos econômicos e o impacto no meio ambiente, derivados do uso indiscriminado de agrotóxicos, resultaram em mais pesquisas sobre o desenvolvimento de sistemas de controle biológico como uma alternativa ao controle químico (Mariano & Kloepper, 2000; Nordlund, 1996; Romeiro, 1995).

Um grupo de organismos que merece atenção quando se trata da busca por antagonistas é o dos actinomicetos, rizobactérias reconhecidas pela sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas (Miller *et al.*, 1989), bem como de se adaptarem com facilidade ao solo como habitat natural, o que lhes confere uma vantagem competitiva pela grande importância na atuação do estabelecimento do equilíbrio entre as interações microbianas (Williams, 1982).

Relata-se também na literatura a capacidade das rizobactérias de induzir resistência sistêmica, fenotípicamente similar à resistência adquirida. Essa característica, mediada por rizobactérias não-patogênicas, tem sido demonstrada contra fungos, bactérias e viroses em *Arabidopsis*, feijão, pepino, tabaco e tomate, conduzidos em experimentos em que a rizobactéria e o patógeno foram mantidos espacialmente separados (Van Loon *et al.*, 1998).

A utilização de microrganismos na agricultura, com o intuito de se elevar a produtividade das culturas e, ao mesmo tempo, melhorar o seu estado fitossanitário, agindo como bioprotetores, vem ganhando enfoque nas principais unidades pesquisadoras do Brasil e do mundo, nas últimas décadas, principalmente aqueles que são agentes indutores de resistência sistêmica em plantas agricultáveis (Alstrom, 1991; Carrer Filho *et al.*, 2001a; Cattelan *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1996; El-Abyad *et al.*, 1993b; Mahaffee & Kloepper, 1994; Mariano & Romeiro, 1999; Van Loon *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1996).

Neste trabalho, pretendeu-se isolar actinomicetos da rizosfera e do rizoplano de tomateiro, formando uma coleção de possíveis antagonistas, e testá-los como prováveis agentes promotores de crescimento de plantas e indutores de resistência sistêmica no tomateiro, através da microbiolização de sementes.

BIBLIOGRAFIA

- Alstrom, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. **Journal of General Applied Microbiology**, v.37, p. 495-498, 1991
- Anderlini, R. A. *Cultura do Tomate*, Editora Litexa Portugal, Porto-Lisboa. 1982, 15 p
- Atlas, R. M. & Bartha, R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4 ed., Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, California. 1997, 694 p
- Barreto, M. & Scaloppi, E. G. (2000). Sistemas de previsão de hortaliças. In *Manejo integrado-doenças, pragas e plantas daninhas* (ZAMBOLIM, L., ed.), pp. 169-186. UFV, Viçosa.
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Garcia, F. A. O., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Deuner, C. C. & Batista, U. G. Seleção de Actinomicetos como Promotores de Crescimento e como Indutores de Resistência Sistêmica em Tomateiro à Mancha Bacteriana Pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. (Abstract), 2001^a
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G. & Fuhrmann, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Soc. Am. J.**, v.63, p. 1670-1680, 1999
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. & Kloepper, J. W. (1996). The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In *Management of Soil Borne Diseases* (Utkhede, R. S. & Gupta, V. K., eds.), pp. 164-184. Kalyani, New Delhi.
- El-Abyad, M., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R. & El-Sabbagh, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.149, p. 185-195, 1993b
- Fonseca de Souza, F. (2001). Empresa e Meio Ambiente, pp. 3. UFV, Viçosa.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. & Zitter, T. A. *Compendium of Tomato Diseases.*, APS Press. 1991, 73 p

- Mahaffee, W. F. & Kloepper, J. W. (1994). Applications of plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems* (Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. & Grace, P. R., eds.), pp. 23-31. CSIRO, Melbourne.
- Mariano, R. L. R. & Kloepper, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p. 121-137, 2000
- Mariano, R. L. R. & Romeiro, R. S. (1999). Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In *Controle Biológico* (Soares de Melo, I. & Lúcio de Azevedo, J., eds.), Vol. 02, pp. 305-324. EMBRAPA-Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.
- Mello, I. S. & Azevedo, J. L. *Controle Biológico* (Mello, I. S. & Azevedo, J. L., Eds.), v.2, Embrapa. 2000, 387 p
- Miller, H. L., Henken, G. & Van Veen, J. A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p. 656-660, 1989
- Nordlund, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17 (2), p. 35-44, 1996
- Romeiro, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*, Imprensa Universitária, Viçosa, MG. 1995, 283 p
- 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. 453-83, 1998
- Wei, L., Koeppler, J. W. & Tuzun, S. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, p. 221-224, 1996
- Williams, S. T. Are antibiotics produced in soil? **Pedobiologia**, v.23, p. 427-435, 1982
- Zambolim, L. & Vale, F. X. R., COSTA, H. *Controle integrado das doenças de hortaliças*, UFV, Viçosa. 1997, 122 p

SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS ANTAGONISTAS ACTINOMICETOS CONTRA PATÓGENOS DA CULTURA DO TOMATEIRO

RESUMO

Cento e dezessete actinomicetos, sendo 96 obtidos pela diluição seguida de semeio de uma suspensão de solo de rizosfera e de rizoplano de tomateiro em meio de estrato de solo-ágar, e 21 de culturas selecionadas por Moura (1996), no trabalho com *Ralstonia solanacearum* foram utilizadas. Suspensão aquosa de propágulos de cada um dos actinomicetos foi utilizada para a microbiolização de sementes de tomateiro (Santa Cruz 'Kada') por embebição, seguindo-se plantio em solo não esterilizado. Paralelamente, foi conduzido teste de colonização de raízes, pelo bioensaio de germinação em ágar-água, e testes de antibiose contra os patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Alternaria solani*, pelo método da sobrecamada. Foram encontrados dois actinomicetos que apresentaram um amplo espectro de ação, inibindo os três patógenos desafiantes, sendo que a maioria dos isolados não teve nenhum efeito inibitório. Cerca de 70% dos actinomicetos foram capazes de colonizar o sistema radicular do tomateiro em condições gnotobióticas. Seleção massal, realizada em casa de vegetação, utilizando dois patógenos desafiantes, *P. syringae* pv. *tomato* e *A. solani*, permitiu selecionar, pela contagem do número de lesões, 7 antagonistas mais promissores. Esses também foram investigados como possíveis promotores de crescimento de plantas, encontrando-se dois actinomicetos que diferiram significativamente da testemunha pela contagem do número de folhas e pela mensuração dos pesos da matéria fresca e seca. Quando os 7 actinomicetos foram novamente testados contra os dois patógenos-modelo, o actinomiceto RD-01 foi selecionado como o mais promissor, pois atuou significativamente na redução do número de lesões, mantendo assim uma conduta estável, verificada pela repetibilidade de resultados.

MASS SELECTION OF ACTINOMYCETES AS ANTAGONISTS TO TOMATO PATHOGENS

ABSTRACT

One hundred and seventeen actinomycetes were obtained from rhizospheric soil sampled near healthy tomato plants and from root cutting washes, by serial dilution of both soil suspensions and root washes followed by plating in soil extract-agar medium. Suspensions of propagules of actinomycetes were obtained in saline and used for microbiolization of tomato seeds (Santa Cruz 'Kada') by soaking overnight. A root colonization bioassay was carried out with microbiolized seeds. Also, "in vitro" antibiosis tests were run with every actinomycete against the tomato pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Alternaria solani*. In a greenhouse, plants arisen from microbiolized seeds were artificially inoculated with two tomato pathogens - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and *Alternaria solani* - by spraying them with a inoculum suspension and, after the incubation period, the protection was evaluated by lesion counting. The "in vitro" antibiosis assays indicated that 2 out 117 antagonists presented a wide antagonistic potential by inhibiting all three pathogens. The root colonization bioassay showed that nearly 70% of the isolates did colonize tomato root system under the set gnotobiotic conditions. The mass selection, in greenhouse, indicated that 7 actinomycetes out of 117 protected plants against the three challenging pathogens, according to results of lesion counting. The seven antagonists with the best performance as inducers of systemic resistance were retested, with a larger number of replicates against the aforementioned pathogens and one isolate was selected for further experiments.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) é originário do continente sul-americano, de regiões dos Andes, no Peru, Equador e Chile, e sua domesticação e cultivo, parece terem ocorrido primeiramente nas antigas civilizações do México. O consumo do tomate passou a ter amplo emprego na dieta humana pelo reconhecimento do seu valor alimentício e pela versatilidade de uso, seja ao natural ou industrializado (Tigchelaar, 1991).

A produção de tomate no mundo atual é de aproximadamente 99 milhões de toneladas, num total de mais de 3,0 milhões de hectares cultivados (FAO, 2001). No Brasil, a produção chega a pouco mais de 3,0 milhões de toneladas numa área de 56.350 ha, colocando o País no 8º lugar na produção mundial, sendo Goiás e Minas Gerais os maiores Estados produtores, com cerca de 721 e 627 mil toneladas respectivamente, seguidos por São Paulo, com 625 mil toneladas (IBGE, 2000).

Para alcançar tais níveis de produção e produtividade, com boa qualidade de frutos e uniformidade na produção, houve uma busca por plantas altamente produtivas, num processo que ocasionou a chamada “erosão gênica”, ou o “efeito vertifolia” (Wornock, 1990), quando genes que conferiam rusticidade e, conseqüentemente, resistência a doenças foram perdidos nos processos de melhoramento visando características agronômicas desejáveis. Tudo isso favoreceu o aumento do ataque de pragas e doenças na cultura, levando esta solanácea a ser susceptível a mais de 200 doenças de diversas etiologias (Agrios, 1997; Taylor, 1986).

Em conseqüência, a cultura do tomateiro é uma das que mais demandam o uso de defensivos durante o processo de cultivo e, dentre os agrotóxicos, os fungicidas representam cerca de 54% da receitas, em relação aos herbicidas, acaricidas e inseticidas (IBGE, 1997).

Paralelamente, vem aumentando a preocupação com efeitos adversos dos agro-químicos na saúde humana e no meio ambiente e com as conseqüências do uso incorreto de pesticidas e adubos sintéticos, que causam graves impactos

ambientais e intoxicações alimentares, restringindo legal ou comercialmente o seu uso (Uykhede, 1996).

A busca por microrganismos benéficos como alternativa para aumentar a produtividade de plantas, melhorando o seu estado fitossanitário, vem sendo um dos principais objetivos da exaustiva pesquisa agrícola nos últimos anos (Nordlund, 1996; Romeiro, 1995).

Segundo Baker & Cook (1974), o controle biológico de doenças de plantas visa reduzir a densidade de inóculo ou da atividade de um patógeno ou parasita, pois estes dependem freqüentemente de atividades e, ou interações microbianas com potencial para combaterem os agentes causadores de enfermidades em plantas. Essa é uma alternativa viável, principalmente quando empregada com outros métodos de controle, apresentando baixo custo e pouca agressividade ao ecossistema.

1.1. Aspectos Morfológicos, Fisiológicos e Sistemáticos dos Actinomicetos

Os actinomicetos são rizobactérias Gram-positivas, com altos teor de relação molar G+C em seu DNA (Connell, 2001). Têm crescimento pseudo-micelial, são formadores de estruturas de resistência, como endósporos ou estruturas especializadas de esporos (Staley *et al.*, 1984), que lhes conferem rusticidade, adaptação e capacidade de sobrevivência em ambientes inóspitos.

Os endósporos são formados por fragmentações pseudo micelial (Bradbury, 1986), suas características morfo-fenológicas e a forma pelas quais as cadeias de esporos se apresentam são de fundamental importância para a caracterização taxonômica da maioria dos gêneros conhecidos e estudados (Schaad *et al.*, 2000; Shirling & Gottlieb, 1966).

Os actinomicetos são aeróbicos estritos, embora algumas espécies sejam capazes de sobreviver com reduzida tensão de oxigênio. Estes são considerados microaerófilos (Bradbury, 1986).

Esses microrganismos podem exibir uma capacidade de produção de enzimas, como proteases, amilases, invertases, pectinases e oxidases, podem

produzir vitaminas como B₁₂, tiamina e seus derivados, e antibióticos (Waksman, 1953), o que os tornam excelentes candidatos a agentes de biocontrole.

1.2. Actinomicetos como Potenciais Agentes de Biocontrole

O solo é um habitat naturalmente diversificado, com comunidades biológicas altamente complexas, nas quais encontram-se diferentes formas de organismos, tanto eucariotas como procariotas, interagindo num ambiente dinâmico e em estado de equilíbrio.

Os solos que não estão sofrendo as influências das raízes de vegetais podem ser considerados como um ambiente oligotrófico, já que são geralmente pobres em fontes de carbono disponíveis. As raízes das plantas representam uma das principais fontes de introdução de carbono no solo. Esse ambiente ao redor das raízes ou o volume de solo que é influenciado biológica e bioquimicamente pelo sistema radicular é conhecido como rizosfera (Bowen & Rovira, 1991). Exudatos e secreções criam o “efeito rizosfera”, em razão da intensa atividade microbiana a ele associada (Atlas & Bartha, 1997; Bowen & Rovira, 1991).

Nesses ambientes, alguns procariotas encontram proteção contra o antagonismo da microflora contígua, ocupando nichos ecológicos na rizosfera e/ou no rizoplano de plantas superiores, onde sobrevivem, multiplicam-se e atuam (Curl, 1982). Estes organismos têm sido semanticamente denominados rizobactérias (Chen *et al.*, 1996; Lazarovits & Nowak, 1997).

A forma com que as plantas respondem à colonização da rizosfera e/ou do rizoplano por rizobactérias depende de muitos fatores (Mariano & Kloepper, 2000), variando desde uma ausência de resposta a uma resposta benéfica e, ou, até prejudicial (Shippers *et al.*, 1987).

As bactérias que exercem efeitos benéficos nas plantas, promovendo crescimento e/ou atuando como agentes de biocontrole, têm sido denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (Mariano & Kloepper, 2000), ou “Plant Growth-Promoting Rizobacteria (PGPR) (Kloepper & Schroth, 1978), YIB (Yield Increase Bactéria) (Chen *et al.*, 1996), ou, ainda,

biocontrol-PGPB (Bashan & Holguin, 1998). Aquelas que exercem um efeito deletério sobre seus hospedeiros são ditas DRB (Deleterious Rhizobacteria) (Gutierrez Mañero *et al.*, 1996).

Uma condição para ser considerada uma PGPR é ser capaz, dentre outras coisas, de colonizar o sistema radicular (Benizri *et al.*, 2001; Romeiro *et al.*, 1999; Van Loon *et al.*, 1998). A colonização de raízes é um processo ativo em que a bactéria multiplica-se na espermosfera em resposta a exudados da semente (Kloepper *et al.*, 1985), adere-se à superfície da raiz (Suslow, 1982; Weller, 1983) e coloniza o sistema radicular de plantas em desenvolvimento, mesmo em solos contendo microrganismos nativos (Kloepper *et al.*, 1980). Exercendo competição com a microflora adjacente, a bactéria pode estabelecer-se e persistir nas raízes de plantas cultivadas, resultando em plantas maiores, mais saudáveis, mais vigorosas e mais produtivas (Chen *et al.*, 1996).

Segundo Chen *et al.* (1996), a procura por microrganismos antagonistas a patógenos de plantas deve ocorrer em amostras de solo junto ao hospedeiro cujas doenças deseja-se controlar, visto exibir uma certa especificidade da associação rizobactéria-plantas (Kloepper, 1996; Romeiro, 1999).

Os actinomicetos adaptam-se a diferentes condições ambientais e são considerados pela grande quantidade de metabólitos e de substâncias antimicrobianas produzidos pela maioria das espécies (Locci, 1984; Miller *et al.*, 1989), inclusive em solos (Korn-Wendisch & Kutzner, 1992).

Assim como outros microrganismos que habitam naturalmente os solos, os actinomicetos sofrem influências diretas e indiretas de fatores como tipo de solo, teor de matéria-orgânica, pH, conteúdo de água, oxigênio, concentração de CO₂ e temperatura (Locci, 1984; Moura, 1996).

Este trabalho teve como finalidade avaliar, em laboratório e em casa de vegetação, a capacidade dos actinomicetos amostrados do sistema radicular de plantas de tomateiro atuarem como agente de biocontrole.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento dos Actinomicetos

Nos municípios goianos de São Miguel do Passa Quatro e Cristianópolis, localizados em regiões produtoras de tomate, foram coletadas amostras de solo de rizosfera e rizoplano de plantas de tomateiro. As amostras foram processadas no Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, sem e com pré-tratamento térmico a 70 °C, durante 72 horas, a fim de inativar a maioria dos microrganismos não actinomicetos durante a fase de isolamento (Williams *et al.*, 1972).

Para o método de diluição serial em placas, 10g de solo rizosférico sofreram extração em 100 ml de solução salina (0,85% NaCl), sob agitação contínua em temperatura de 30 °C, por 24 horas. A suspensão de solo sofreu uma diluição em série (fator 10). De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 100 µl, que foram semeadas, com auxílio de alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio extrato de solo-ágar (Pramer & Schmidt, 1964) e em meio de extrato de solo-ágar acrescido de cicloeximida e nistatina, numa concentração final de 100 ppm (Williams & Davis, 1965).

Para o caso de espalhamento direto de solo na superfície do meio sólido, foram utilizados 500 mg de solo rizosférico peneirado em malha de 1,0 mm e dispensado na parte central das placas, as quais foram mantidas em incubadoras a 30 °C, por 02 semanas.

Isolamentos de actinomicetos diretamente do rizoplano foram obtidos pela lavagem das raízes em água corrente, seguindo-se o seccionamento e a transferência para Erlenmeyers contendo solução salina (0,85 % NaCl), numa proporção de 10g de raízes para 100 ml, a extração ocorreu após agitação contínua a 30 °C, por 24 horas. O extrato sofreu diluição serial e 100 µl de cada diluição foram semeadas, com auxílio de alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio extrato de solo-ágar (Pramer & Schmidt, 1964) e em meio de

extrato de solo-ágar acrescido de cicloeximida e nistatina numa concentração final de 100ppm (Williams & Davis, 1965).

Inspeções diárias permitiram a repicagem de colônias de actinomicetos individualizadas para tubos inclinados, contendo meio extrato de solo-ágar.

2.2. Manutenção e cultivo dos patógenos

Patógenos que incitam doenças fúngicas ou bacterianas em tomateiros foram obtidos por isolamento, segundo metodologia apresentada por Romeiro (2001a), ou em coleção de culturas fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa.

Os organismos patogênicos fúngicos foram mantidos e cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), com exceção dos fungos *Corynespora casseiicola* e *Stemphylium solani*, que foram colocados em meio V8-ágar. Todas as culturas fúngicas foram preservadas em óleo mineral, em incubadoras a 4 °C.

Os patógenos bacterianos foram mantidos e cultivados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970), menos a fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, que foi cultivada em meio GYCA. Todas as bactérias foram preservadas em óleo mineral e em água mineral estéril (Romeiro, 2001b), mantidas a 4 °C em incubadora previamente regulada.

2.3. Cultivo e preservação dos actinomicetos

Os actinomicetos foram padronizadamente cultivados, multiplicados e mantidos em tubos inclinados, contendo meio de extrato de solo-ágar. Esses microrganismos foram preservados com repicagens semestrais tubo a tubo (Romeiro, 2001b) e em óleo mineral, a 4 °C.

2.4. Produção de substâncias antimicrobianas “*in vitro*”

Verteu-se, em placas de Petri, uma camada de meio de extrato de solo-ágar (Pramer & Schmidt, 1964), procedendo-se ao semeio de quatro culturas de actinomicetos equidistantemente distribuídos, incubando-se, a seguir, a 30 °C, por 72 horas.

Após a morte dos actinomicetos, por emanção de clorofórmio depositado na tampa da placa, colocado em posição invertida, durante 15 minutos, seguindo-se exposição à radiação UV por 20 minutos, meio semi-sólido, ao qual incorporaram-se propágulos de cada patógeno (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ou *Alternaria solani*), foi vertido nas placas de modo a formar uma sobrecamada, e mantidas em incubadoras reguladas a 28 °C.

2.5. Bioensaio de colonização de raízes

Para detectar a eventual habilidade dos actinomicetos para colonizar o sistema radicular de plantas de tomate, foi usada a metodologia descrita por Romeiro et al. (1999), em que sementes ‘Santa Cruz Kada’ foram microbiolizadas, por embebição, em uma suspensão de propágulos de cada cultura de actinomiceto em solução salina estéril. Após 24 horas, as sementes foram transferidas para tubos contendo meio ágar-água 0,6 % e deixadas para germinar em temperatura ambiente.

Turvação e depósito leitoso ao longo das raízes, visualizadas contra a luz, foram interpretados como habilidade das rizobactérias para colonizar o sistema radicular de tomateiro.

2.6. Seleção massal dos actinomicetos, como agentes de biocontrole com o uso de patógenos desafiantes, em casa de vegetação

A seleção dos actinomicetos, candidatos a agentes de biocontrole por meio de indução de resistência sistêmica, foi realizada pela inoculação de mudas oriundas de sementes microbiolizadas em suspensão de propágulos de cada um dos actinomicetos, inoculando-se *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Alternaria solani*.

O ensaio com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, como patógeno desafiante, foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo duas plantas germinadas em solo comum, compondo a unidade experimental.

Numa segunda etapa, os 37 antagonistas mais promissores foram retestados, com cinco repetições por tratamento, tendo *Alternaria solani* como patógeno fúngico desafiante.

Pelo uso de *Alternaria solani* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* como patógenos desafiantes e utilizando um índice* pré-determinado, os antagonistas pré-selecionados foram reduzidos para 07 mais promissores.

$$*\text{Índice} = \frac{\text{n}^\circ \text{ lesões tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ lesões controle}} \times 100$$

Esses foram novamente testados, concomitantemente com os dois patógenos-modelo, desta vez com dez repetições por tratamento, sendo duas plantas por repetição, germinadas em solo comum.

Para a realização do ensaio em cada patossistema, incluiu-se o pior tratamento na primeira e na segunda etapas da seleção como controle adicional.

Com o intuito de correlacionar o biocontrole com a promoção de crescimento de plantas de tomateiro, os 7 actinomicetos pré-selecionados como os mais promissores agentes de biocontrole, foram investigados como potenciais promotores de crescimento de plantas, através da microbiolização de sementes descrita anteriormente, sendo dez repetições por tratamento e uma planta constituindo cada unidade experimental. Procedeu-se ao plantio em solo comum e avaliaram-se, após 30 dias, a altura de plantas, tomando-se, como padrão, a distância do ponto de inserção das folhas cotiledonares até a gema apical, o número de folhas e de folíolos, e os pesos das matérias fresca e seca (submetidas à secagem a

70 °C, por 72 horas). Sementes imersas em solução salina estéril foram utilizadas como testemunha.

2.6.1. Preparo do inóculo, inoculação e avaliação

Para as inoculações com a fitobacteriose, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi mantido a 28 °C, por 24 horas, e uma suspensão bacteriana foi ajustada para $OD_{540} = 0,2$ ao espectrofotômetro.

Com relação a *Alternaria solani*, água esterilizada foi vertida em placas de Petri contendo a cultura pura em meio BDA, seguindo-se raspagem da superfície das colônias com auxílio de uma alça de Drigalsky, filtrando-se, em seguida, em gaze e ajustando-se a concentração para $3,5 \times 10^3$ conídios/ml.

As inoculações dos patógenos desafiantes em plantas de tomateiro foram procedidas quando estas atingiram idade de aproximadamente trinta dias pós-germinação ou quando da expansão completa da quinta folha.

Um dia antes da inoculação, as plantas foram submetidas a um pré-tratamento em câmara de nevoeiro, a 25°C. Imediatamente após a inoculação por atomização, as plantas foram recolocadas na câmara úmida por mais 24 horas e, em seguida, deixadas em casa de vegetação, onde permaneceram até o aparecimento de sintomas típicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de Actinomicetos

Foram utilizadas 117 culturas de actinomicetos, 94 isoladas por diferentes metodologias (Quadro 1) e 23 selecionadas por Moura (1996) em seu trabalho com *Ralstonia solanacearum*.

Muitos isolamentos apresentaram colônias distintas, no crescimento, cor e textura, demonstrando a biodiversidade microbiana que compõe a região da

rizosfera (Atlas & Bartha, 1997; Benizri *et al.*, 2001; Bowen & Rovira, 1991; Soares de Melo, 2000).

Quadro 1 - Culturas de actinomicetos de diferentes origens obtidas por diferentes métodos de isolamento

Origem/Método	Nº de Culturas
SOT	27
SON	20
SCT	21
SCN	15
RD	07
RC	04
AMB	23
TOTAL	117

SOT - Solo rizosférico de tomateiro cultivado em sistema orgânico submetido ao pré-tratamento de 70 °C por 72 horas

SON - Solo rizosférico de tomateiro cultivado em sistema orgânico

SCT - Solo rizosférico de tomateiro cultivado pelo sistema convencional e submetido ao pré-tratamento de 70 °C por 72 horas

SCN - Solo rizosférico de tomateiro cultivado pelo sistema convencional

RD - Rizoplano de plantas de tomateiro cultivado pelo sistema convencional (planta doente)

RC - Rizoplano de plantas de tomateiro cultivado pelo sistema convencional (planta sadia)

AMB - Culturas pré-selecionadas por Moura (1996).

3.2. Teste de Colonização de Raízes e de Antibiose

A capacidade e habilidade dos potenciais antagonistas para colonizarem o sistema radicular de tomateiro, em condições gnotobióticas, foram elevadas. Cerca de 70% dos 117 isolamentos foram positivos no teste de colonização de raízes, o que se presume comprovada motilidade, adaptação e crescimento.

Os dados do teste de antibiose acham-se no Quadro 2. Dentre as culturas testadas, 88,8 % não tiveram nenhum efeito inibitório contra os patógenos testados, e apenas 6,0 % mostraram ser capazes de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico testado. Em contraposição, 4,3 % inibiram pelo menos um agente bacteriano, e 1,7 % mostrou ser possuidor de produtos de amplo espectro de ação.

A observação dessas características é o primeiro passo para uma efetiva interação entre a planta hospedeira e os microrganismos do solo, isto é, uma ação

benéfica, deletéria, ou mesmo nula da associação rizobactéria - planta (Benizri et al., 2001; Romeiro et al., 1999; Simons *et al.*, 1996).

Quadro 2 - Presença (+) ou ausência (-) de halo de inibição contra dois patógenos bacterianos e um fúngico pela ação dos actinomicetos testados.

Código das Culturas	Patógenos		
	Pst	Xcv	As
SOT- (02, 03, 04, 05, 06, 08, 09, 10, 10A, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18, 19, 20, 21, 22, 23, 51, 202); SON- (01, 02, 03, 04, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 13, 18); RC- (01, 02, 03, 22); RD- (02, 03, 04, 05, 06, 07, 31); SCT- (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 8A, 8B, 09, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 39, 101); SCN- (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 13, 15); AMB- (178, 1781, 113A, 113B, 113C, 113, 76B, 76A, 125, 76, 182, 172, 110A, 110B, 110C, 114, 04, 19, 17A, 78, 02, 102, 22)	-	-	-
SON- (05, 17)	+	+	+
SOT- 07; SCT- 12	-	+	-
RD- 01; SON- 08; SCN- (12, 14); SOT- 01	-	-	+
SON- (14, 15, 16)	+	-	-
SON- 19	+	+	-

Pst- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; **Xcv-** *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; **As-** *Alternaria solani*.

Essas avaliações qualitativas foram realizadas com o intuito de averiguar certas propriedades de uma população de culturas microbianas, a fim de propiciar uma abreviação comportamental das interações antagonistas-fitopatógeno e antagonistas-hospedeiro em condições gnotobióticas, não sendo, portanto, uma fase decisiva no processo de seleção, já que muitos resultados observados “in vitro” geralmente não correspondem ao que acontece em casa de vegetação ou em campo (Bettiol, 1991; Mariano, 1993).

3.3. Seleção massal dos actinomicetos em casa de vegetação pelo uso de dois patógenos desafiantes

Na primeira etapa, foram selecionados 37 actinomicetos que diferiram significativamente, pelo teste Skott-Knott ($\alpha= 0,05$) dos demais tratamentos e da

planta-controle, pela redução do número de mancha pequena bacteriana incitada pela fitobacteriose *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Essas culturas foram selecionadas para a segunda etapa, averiguando-se sua capacidade na redução de sintomas incitados por *Alternaria solani*, sem diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o tratamento-controle.

Logo, a seleção dos antagonistas resultou da combinação de resultados dos dois patossistemas investigados. Os 7 actinomicetos foram selecionados por terem atuado na redução de 40 % da severidade de doença, em relação ao tratamento-controle, nos patógenos desafiante (Quadro 3), representados pelos códigos SOT-006, RD-001, SOT-010, SCT-001, SOT-001, SOT-002, AMB-078, em negrito.

Ao repetir os bioensaios no tempo, com os 7 actinomicetos pré-selecionados, utilizando os dois patossistemas-modelo, pôde-se verificar que, aumentando o número de repetições por tratamento, houve maior perspectiva de diferença entre as médias dos tratamentos pelo número de lesões por planta, o que aumentou a confiabilidade dos dados observados (Gráficos 1 e 2).

O actinomiceto RD-01 foi selecionado por este trabalho por ser de grande potencialidade como agente de biocontrole de doenças, pois, em ensaios realizados em casa de vegetação, observou-se que o número de lesões/planta incitadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Tukey, α : 0,05) e por *Alternaria solani* (Tukey, α : 0,01) foi significativamente reduzido.

Este isolado manteve uma conduta estável durante toda as fases da seleção, através de uma aparente manutenção do nível de doença em relação ao tratamento-controle, sobressaindo significativamente entre os demais nos dois patossistemas testados.

Aqueles actinomicetos que foram ineficientes na primeira e na segunda etapa da seleção, com os dois patossistemas, representados pelos antagonistas SON-06 e AMB-172, incluídos no bioensaio como controles adicionais, mostraram-se novamente insuficientes em restringir as lesões estimuladas pelos patógenos desafiante.

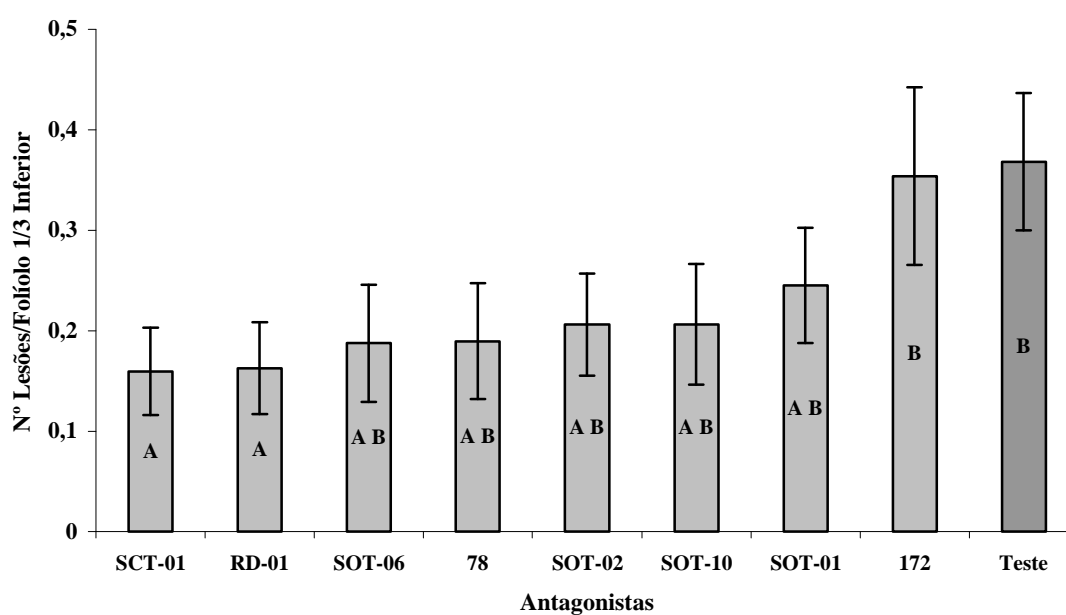
Quadro 3 - Número de lesões por folíolo (N°L/F) e severidade (%) em plantas de tomateiro, previamente tratadas com actinomicetos pela microbiolização de sementes, inoculadas com dois patógenos desafiantes

Tratamento	Colonização de Raízes	Antibiose			Severidade			
					Pst		As	
		Pst	As	Xcv	N°L/F	%	N°L/F	%
SOT-006	-	-	-	-	2,879	30,24	0,485	60,00
SOT-019	+	-	-	-	3,327	34,94	0,748	92,54
AMB-172	-	-	-	-	3,995	41,95	0,800	99,01
AMB-113	+	-	-	-	4,045	42,48	0,601	74,39
RD-001	+	-	+	-	4,069	42,73	0,437	54,13
SCT-013	-	-	-	-	4,280	44,94	0,592	73,27
SON-001	+	-	-	-	4,429	46,51	0,639	79,09
AMB-022	+	-	-	-	4,510	47,36	0,611	75,70
SOT-010	+	-	-	-	4,628	48,60	0,453	56,14
AMB-178	-	-	-	-	4,689	49,24	0,665	82,34
SCT-001	-	-	-	-	4,891	51,37	0,335	41,51
SON-010	-	-	-	-	4,944	51,92	0,648	80,23
SOT-001	+	-	+	-	5,067	53,21	0,457	56,58
SON-005	+	+	+	+	5,090	53,53	0,729	90,28
SOT-002	+	-	-	-	5,187	54,47	0,475	58,88
AMB-078	+	-	-	-	5,379	56,48	0,455	56,36
SCN-010	+	-	-	-	5,382	56,52	0,591	73,21
AMB-1781	-	-	-	-	5,523	58,00	0,593	73,41
SCN-009	+	-	-	-	5,551	58,29	0,535	66,23
SOT-008	+	-	-	-	5,641	59,24	0,554	68,55
SON-012	+	-	-	-	5,693	59,78	0,574	71,03
AMB-110A	+	-	-	-	5,720	60,06	0,611	75,61
RD-002	-	-	-	-	5,724	60,11	0,544	67,41
RD-004	-	-	-	-	5,833	61,25	0,451	55,81
SCN-003	-	-	-	-	5,938	62,35	0,760	94,11
SCT-012	+	-	-	+	5,958	62,56	0,667	82,57
SOT-017	-	-	-	-	6,075	63,79	0,452	55,95
SCT-006	+	-	-	-	6,197	65,07	0,462	57,21
SON-007	+	-	-	-	6,197	65,08	0,377	46,69
SCN-015	-	-	-	-	6,205	65,16	0,454	56,19
SCN-005	+	-	-	-	6,289	66,03	0,505	62,59
SCN-004	-	-	-	-	6,306	66,22	0,562	69,56
SCT-017	+	-	-	-	6,326	66,43	0,487	60,34
SOT-011	-	-	-	-	6,327	66,44	0,541	67,02
AMB-102	+	-	-	-	6,414	67,36	0,669	82,85
RC-022	-	-	-	-	6,586	69,16	0,565	69,98
AMB-113A	-	-	-	-	7,106	74,62	0,467	57,81
Controle	-	-	-	-	9,523	100,00	0,808	100,00

Pst- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; **As**- *Alternaria solani*; **Xcv**- *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

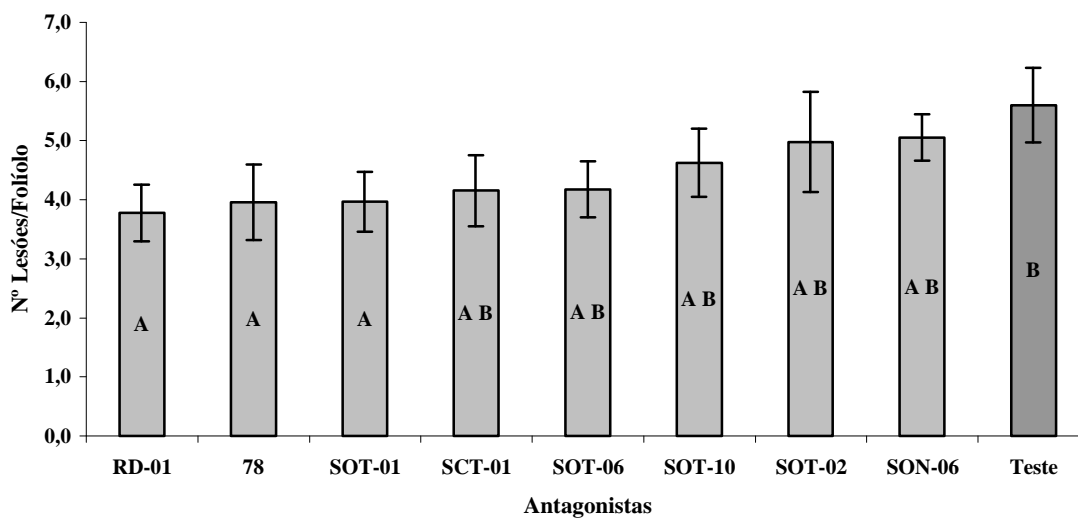
Para comprovação da ação do antagonista como provável indutor de resistência sistêmica em plantas, necessita-se de realizações de ensaios com outros patossistemas, dada a multiplicidade de proteção referida aos indutores bióticos não-patogênicos (Hoffland *et al.*, 1997; Koepler *et al.*, 1997; Romeiro, 1999; Steiner & Schonbeck, 1995; Sticher *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998).

Gráfico 1 - Média de lesões por folíolo (dez repetições) exibida por plantas de tomateiro oriundas de sementes microbiolizadas com os actinomicetos selecionados, inoculados com o patógeno desafiante *Alternaria solani*.



As colunas que se apresentam com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Gráfico 2 - Média de lesões por folíolo (dez repetições) exibida por plantas de tomateiro oriundas de sementes microbiolizadas com os actinomicetos selecionados, inoculados com o patógeno desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.



As colunas que se apresentam com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.4. Actinomicetos pre-selecionados como promotores de crescimento de plantas

Quando os parâmetros de crescimento de plantas foram avaliados com os antagonistas pré-selecionados, obtiveram-se diferenças significativas entre os tratamentos (Quadro 4).

De modo geral, os actinomicetos SOT-10 e SCT-01 promoveram melhor desenvolvimento de plantas de tomate em algumas variáveis observadas evidenciando aumento significativo de 16,31 % no número de folhas verdadeiras completamente desenvolvidas e de 13,81 % no peso da matéria fresca em relação à planta controle quando em associação com o actinomiceto SOT-10, e aumento significativo de 15,38 % no número de folhas, 13,55 % no peso da matéria fresca e 20,38 % de aumento no peso da matéria seca promovida pelo actinomiceto SCT-01, em relação ao tratamento testemunha.

Quadro 4 - Altura de plantas (cm), número de folhas e de folíolos por planta e peso das matérias frescas (PMF em g) e seca (PMS em g) 30 dias pós-emergência de sementes microbiolizadas com cada um dos 07 actinomicetos pré-selecionados.

Tratamentos	Alt. Plantas	Nº Folhas	Nº Folíolos	P.M.F.	P.M.S.
SOT-10	39,10 ¹ a	8,40 a	46,80 a	32,64 a	3,40 ab
SCT-01	39,28 a	8,33 a	45,56 ab	32,57 a	3,64 a
RD-01	40,54 a	7,90 bc	46,40 ab	31,84 ab	3,44 ab
SOT-02	37,54 a	8,00 ab	45,33 ab	31,03 ab	3,46 ab
AMB-078	37,81 a	7,88 bc	44,00 ab	30,94 ab	3,14 ab
SOT-06	38,67 a	7,78 bc	43,67 ab	29,94 ab	3,18 ab
SOT-01	38,52 a	7,60 bc	42,60 b	29,69 ab	3,12 ab
Controle	37,32 a	7,22 c	43,67 ab	28,68 b	3,03 b
C.V.	10,91	10,07	10,39	12,64	17,99

1. Médias (de dez repetições) seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey, α : 0,05.

Estes resultados encontram suporte em relatos de outros pesquisadores sobre desenvolvimento de plantas mediadas por rizobactérias (Cattelan & Hartel, 2000; Dashti *et al.*, 1998; El-Abyad *et al.*, 1993b; Enebak *et al.*, 1998; Kloepper & Schroth, 1978; Kloepper *et al.*, 1980; Kloepper *et al.*, 1991; Lazarovits & Nowak, 1997; Lifshitz *et al.*, 1987; Luz, 2001; Lynch, 1976; Pan *et al.*, 1999; Polonenko *et al.*, 1987) e com trabalhos realizados pela equipe do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (Carrer Filho *et al.*, 2001a; Moura, 1996; Romeiro *et al.*, 1997b; Romeiro *et al.*, 1999; Silva, 1997).

Os actinomicetos rotulados como sendo SOT-10 e SCT-01, podem estar expressando, dentro de uma relação rizobactéria-hospedeiro, uma promoção de crescimento, não sendo correlacionado como agentes de biocontrole.

4. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N. *Plant Pathology*. 4^o ed., Academic Press, New York. 1997, 665p.
- Atlas, R. M. & Bartha, R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4 ed., Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, California. 1997, 694 p.
- Baker, K. F. & Cook, R. J. *Biological control of plant pathogens.*, W.F. Freeman & Co., San Francisco, USA. 1974, 433 p.
- Bashan, Y. & Holguin, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p. 1225-1228, 1998
- Benizri, E., Baudoin, E. & Guckert, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p. 557-574, 2001
- Bettiol, W. *Controle biológico de doenças de plantas*. Bettiol, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos, EMBRAPA-CNPDA, Jaguariuna. 1991, 223-36 p
- Bowen & Rovira. *Plant roots: the hidden half* (Waisel, Y., Eschel, A. & Kafkafi, U., Ed.), Marcel Dekker. 1991, 349-388 p
- Bradbury, J. F. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*, 1. 1 vols, C.A.B. International, Surrey. 1986, 332 p
- Cattelan, A. J. & Hartel, P. G. (2000). Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In *Tópicos em Ciência do Solo*, Vol. 1, pp. 213-234. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa.
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Garcia, F. A. O., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Deuner, C. C. & Batista, U. G. Seleção de Actinomicetos como Promotores de Crescimento e como Indutores de Resistência Sistêmica em Tomateiro à Mancha Bacteriana Pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. (Abstract), 2001a
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. & Kloepper, J. W. (1996). The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In *Management of Soil Borne Diseases* (Utkhede, R. S. & Gupta, V. K., eds.), pp. 164-184. Kalyani, New Delhi.

- Connell, N. D. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p. 446-449, 2001
- Curl, E. A. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. **Plant Disease**, v.66, p. 624-630, 1982
- Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. & Smith, D. L. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. **Plant and Soil**, v.200, p. 205-213, 1998
- FAO. FAOSTAT. (<http://apps.fao.org>). 2001
- Gutierrez Mañero, F. J., Acero, N., Lucas, J. A. & Probanza, A. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. II. Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. **Plant and Soil**, v.182, p. 67-74, 1996
- Hoffland, E., Bakker, P. A. H. M. & Van Loon, L. C. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. **Phytopathology**, v.87, p. 138, 1997
- IBGE. *Anuário Estatístico do Brasil*, 57, Rio de Janeiro, Brasil. 1997, 1-1 -8-32 p
- IBGE. <http://www1.ibge.gov.br/ibge/default.php>. p. 2000
- Kado, C. I. & Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 969 - 979., 1970
- Kloepper, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v.26, p. 406-409, 1996
- Kloepper, J. W., Scher, F. M., Laliberté, M. & Zaleska, I. Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p. 926-9, 1985
- Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Vol. 2: 879-882, 1978
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N. & Miller, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, v.70, p. 1078-82, 1980

- Koeppler, J. W., Tuzun, S., Zehnder, G. W. & Wei, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induced systemic resistance-Historical precedence. **Phytopathology**, v.87, p. 136-137, 1997
- Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H. J. *The family streptomycetaceae*. The prokaryotes, Springer Verlag, New York. 1992, 1027 p
- Lazarovits, G. & Nowak, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Hort Science**, v.32(2), p. 188-192, 1997
- Locci, R. (1984). Straptomycetes and related genera. In *Bergeys Manual of systematics bacteriology* (Williams, S. T., Sharper, M. E. & Holt, J. G., eds.), pp. 2451-2508. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Mariano, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 369-409, 1993
- Mariano, R. L. R. & Kloepper, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p. 121-137, 2000
- Miller, H. L., Henken, G. & Van Veen, J. A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p. 656-660, 1989
- Moura, A. B. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. D.S, UFV. 1996, 112p.
- Nordlund, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17 (2), p. 35-44, 1996
- Pramer, D. & Schmidt, E. L. *Experimental soil microbiology*, Burgess Publishing Company, Saint Paul. 1964, p
- Romeiro, R. S. *Bacterias Fitopatogênicas*, Imprensa Universitária, Viçosa, MG. 1995, 283 p
- Romeiro, R. S. *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*, 56, UFV, Viçosa. 1999, 45 p
- Romeiro, R. S. (2001a). Isolamento de Bacterias Fitopatogênicas a Partir de Órgãos Vegetais Infectados, pelo Método Padrão. In *Métodos em Bacteriologia de Plantas* (Romeiro, R. S., ed.), pp. 37-47. UFV, Viçosa.

- Romeiro, R. S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas* (Romeiro, R. S., Ed.), UFV, Viçosa, MG. 2001b, 279 p
- Romeiro, R. S., Takatsu, A., Uesugi, C. H., Moura, A. B. & Silva, H. S. A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção de crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.24 (Suplemento), p. 255, 1999
- Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3 ed., The American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota. 2000, 373 p
- Shippers, B., Bakker, A. W. & Bakker, P. A. H. M. Interactions of deleterious and beneficial microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p. 339-58, 1987
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.16, p. 313-340, 1966
- Simons, M., Van der Bij, A., Brand, I., Weger, L. A., Wijffelman, C. A. & Lugtenberg, B. J. J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.9, p. 600-607, 1996
- Silva, H. S. A., Leite, R. S. V. & Lima, G. S. A. Efeito de diferentes isolamentos de rizobactérias sobre o crescimento de tomateiro e indução de resistência sistêmica a *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt) Wei. **Fitopatologia Brasileira**, v.22 (suplemento), p. 310, 1997
- Soares de Melo, I. (2000). Isolamento de agentes de biocontrole da rizosfera. In *Controle Biológico* (Melo, I. S. & Azevedo, J. L., eds.), Vol. 3, pp. 15-40. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.
- Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. & Holt, J. G. E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.03. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. pp 1601-2298. 1984, p
- Steiner, U. & Schonbeck, F. (1995). Induced disease resistance in monocots. In *Induced Resistance to Disease in Plants* (Hammerschmidt, R., ed.), Vol. 4, pp. 86-110. Dordrech: Kluwer Academic Pub.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. & Métraux, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p. 235-70, 1997

- Suslow, T. V. *Role of root-colonizing bacteria in plant growth* (Mount, M. S. & Lacy, G. S., Eds.), Vol.I, Academic Press, New York. 1982, 187-223 p
- Taylor, I. B. (1986). Biosystematics of the tomato. In *The Tomato Crop: A Cientific Basis For The Improvement*. (Rudich., J. G. A. a. J., ed.), pp. 1-34. Chapman and Hall, New York.
- Tigchelaar, E. C. (1991). Botany and culture. In *Compendium of tomato disease*. (Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. & Zitter, T. A., eds.), pp. 73. APS Press, St. Paul.
- Uykhede, R. S. Potential and problems of developing bacterial biocontrol agents. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.18, p. 455-462, 1996
- 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. 453-83, 1998
- Waksman, S. A. (1953). **The Biology of the Actinomycetes and Their Economic Importance**. In *Actinomycetales: Morfologia, Biologia e Sistemática* (Sanità, S. A. R. D. I. S. D., ed.), pp. 299, Roma: Fondazione Emanuele Paternò.
- Warnock, S. J. Tomato evolution and its implications for tomato culture. **Hortscience**, v.25(2), p.139-140, 1990.
- Weller, D. M. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. **Phytopathology**, v.81, p. 1508-12, 1983
- Williams, S. T. & Davis, F. L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. **Journal Genetics Microbiology**, v.38, p. 251-261, 1965
- Williams, S. T., Shamemullah, M., Watson, E. T. & Mayfield, C. I. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VI. The influence of moisture tension on growth and survival. **Soil Biology and Biochemistry**, v.4, p. 215-225, 1972

**AMPLITUDE DE EFETIVIDADE DO ACTINOMICETO
SELECIONADO COMO AGENTE DE BIOCONTROLE DE
ENFERMIDADES DO TOMATEIRO**

RESUMO

Investigou-se a amplitude de proteção proporcionada pelo actinomiceto pré-selecionado, RD-01, contra patógenos foliares da cultura do tomateiro em casa de vegetação. Para tal, sementes foram microbiolizadas com propágulos do antagonista, ajustados para $OD_{540} = 0,3$, plantadas em solo não esterilizado e, quando as plantas encontravam-se no estágio de 5-6 folhas definitivas, foram feitas inoculações, por atomização, com os patógenos *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Corynespora cassiicola* e *Stemphylium solani*. Quando do aparecimento dos sintomas típicos, procedeu-se à quantificação da doença, confirmando a efetividade de proteção pela contagem do número de lesões. Foi testada também, a capacidade do antagonista em reduzir a incidência de *Ralstonia solanacearum*, em infectário, não sendo ele eficiente na supressão da murcha bacteriana. Paralelamente, realizou-se, em laboratório, teste de antibiose contra fitobactérias, inibição da germinação de conídios e do crescimento micelial de fungos patogênicos e teste de inibição na liberação de zoósporos em esporângios de *Phytophthora infestans*. O actinomiceto foi eficiente, inibindo a germinação indireta de *Phytophthora infestans*, de conídios dos fungos testados e no desenvolvimento micelial destes, mas não foi capaz de inibir, “in vitro”, o crescimento de fitobactérias.

EFFECTIVENESS RANGE OF AN ACTINOMYCETE SELECTED FOR THE BIOCONTROL OF TOMATO DISEASES

ABSTRACT

An investigation on the amplitude of protection given by a pre-selected actinomycete (RD-01) against foliar tomato pathogens was carried out in the greenhouse. Seeds were microbiolized with antagonist propagules ($OD_{540} = 0,3$), sowed in non-sterilized soil and, when the plants were in the stage of 5 to 6 definite leaves, inoculations were done through atomization with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Corynespora cassiicola* and *Stemphylium solani*. When typical symptoms appeared, the disease was quantified to confirm the effectiveness of protection by counting the number of lesions. The capacity of the antagonist in reducing the incidence of *Ralstonia solanacearum* was tested also, but was not efficient to suppress the bacterial decay. At the same time, a antibiotics test against phyto bacteria was carried out in laboratory, evaluating the inhibition of conidia germination and of the mycelium growth of pathogenic fungi, of inhibition in the release of zoospores from *Phytophthora infestans* sporangia. The actinomycete was efficient, inhibiting the indirect germination of *Phytophthora infestans*, the conidial germination and the mycelial development of the tested fungi, but it was not capable of inhibiting the growth of phyto bacteria “in vitro”.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos químicos em larga escala é responsável pela emergência de populações resistentes de patógenos e pelo efeito destes sobre organismos não-alvo, tornando os tratamentos, em muitos casos, ineficazes e antieconômicos (Mello & Azevedo, 2000). A preocupação com o uso destes produtos e suas implicações tem estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle (Mariano & Kloepper, 2000; Nordlund, 1996).

Na denominação genérica de controle alternativo, estão incluídos os controles biológico e induzido, conhecido também como indução de resistência a patógenos em plantas, que é investigada desde o século XX, quando Chester (1933) propôs o termo “imunidade fisiológica adquirida”. Desde então, vários termos vêm sendo usados para descrever o fenômeno de indução de resistência como “resistência sistêmica adquirida” (Ross, 1961), “resistência translocada” (Hurbert & Helton, 1967) e “imunização de plantas” (Tuzun & Kuc, 1991).

Deve ser entendido que indução de resistência é um estado em que a capacidade defensiva da planta é elevada (Kuc, 1982), ativando mecanismos de resistência latente, que são expressos em subseqüente infecção de um microrganismo patógeno (Ramamoorthy et al., 2000; Van Loon, 1997).

Dois tipos de indução de resistência, distintos quanto à forma pela qual são induzidos, governados por mecanismos bioquímicos diferentes, mas que apresentam resultados fenotípicamente semelhantes, são reconhecidos por autoridades da área de indução de resistência em plantas, a saber: SAR (Systemic Acquired Resistance) e ISR (Induced Systemic Resistance), fenômenos em que plantas, após serem expostas a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, com caráter de sistemicidade (Koeppler et al., 1997; Sticher et al., 1997a; Van Loon et al., 1998).

Apesar de pequenas discordâncias (Pieterse et al., 1998; Van Loon, 1997; Van Loon et al., 1998) alguns autores pressupõem que, quando os agentes indutores são microrganismos patogênicos ou ativadores químicos, como os derivados

benzotiadiazólicos e outros compostos (Benhamou & Belanger, 1998), o qual leva ao controle múltiplo, mas não generalizado de patógenos, estes evidenciam o fenômeno denominado SAR (Koepler et al., 1997), que envolve o acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com Patogênese) como mecanismo de defesa da planta, sua indução é salicilato-dependente e pode resultar em alterações externas na planta, como necrose (Van Loon, 1997).

No caso de ISR, não há acúmulo de PRPs. A planta que sofreu indução não exhibe alterações, o agente indutor é usualmente um microrganismo não-patogênico e não-simbionte e sua indução não é salicilato-dependente, parecendo haver uma rota de sinalização mais associada a jasminato e etileno (Van Loon, 1997; Van Loon et al., 1998).

1.1. Indução de resistência sistêmica a patógenos em plantas mediada por rizobactérias

Embora as plantas, na natureza, estejam expostas a um grande número de microrganismos, a resistência prevalece como regra, enquanto a susceptibilidade mostra-se como exceção (Agrios, 1997). Esses mecanismos estruturais e/ou bioquímicos de proteção tornam-se ineficientes quando a planta é infectada por um microrganismo patogênico (Pascholati & Leite, 1994; Van Loon et al., 1998).

Em contraposição, plantas possuem outros mecanismos de defesa ainda mais eficientes como resistência dinâmica, pós-infeccional ou induzida, que, aparentemente, permanecem inativos ou latentes, somente sendo ativados quando elas são expostas e, ou, entram em contato com agentes de indução (Agrios, 1997; Sticher et al., 1997a).

Durante os anos 80, foram desenvolvidos trabalhos envolvendo a ação de rizobactérias que possuem atividades de controle biológico. Os pesquisadores relataram que estes organismos entram em interação com as plantas, podendo ativar sistemas de defesa do hospedeiro (Scheffer, 1983; Voisard et al., 1989).

Tratamento de sementes de ervilha com *P. fluorescens* tem resultado em formação de barreiras estruturais, formação de calose e acúmulo de compostos

fenólicos no sítio de penetração de hifas de *Pythium ultimum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Benhamou et al., 1996a). Trabalho similar com ervilha, realizado por Benhamou et al. (1996b), obteve a produção de enzimas semelhantes a quitinases e a B-1,3 glucanases. Essas enzimas líticas acumularam-se no hospedeiro no sítio de penetração do fungo *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, resultando na degradação da parede celular. Colonização de raízes do feijoeiro por bactéria fluorescente foi correlacionada com indução de PRPs e resistência sistêmica contra *Botrytis cinérea* (Zdor & Anderson, 1992).

Pesquisas realizadas em plantas de tomateiro (Benhamou et al., 1998; M'Piga et al., 1997; Murphy & Zehnder, 2000; Raupach et al., 1996) evidenciam indução de resistência mediada por PGPRs e por actinomicetos (Carrer Filho et al., 1999; El-Abyad et al., 1993b; Romeiro et al., 1997) quando estes foram utilizados para microbiolização de sementes.

Recentemente, trabalhos sobre o espectro de ação da ISR mediado por PGPR contra diferentes patógenos em diferentes culturas vêm ganhando importância (Hoffland et al., 1997; Koepller et al., 1997; Wei et al., 1996), sendo este mais recompensador em relação a um estreito espectro de proteção de doenças. Conseqüentemente, a seleção de cepas com potencial para induzir resistência sistêmica contra múltiplos patógenos vem a ser um importante trabalho durante a entrega de agentes microbianos ao campo.

A utilização de actinomicetos é balizada pelo fato de serem habitantes dos mais diversos tipos de solos (Sykes & Skynner, 1973), podendo colonizar a rizosfera (Miller *et al.*, 1989) e se comportarem como endófitas (Sardi et al., 1992), havendo, portanto, possibilidade de agirem como agentes bióticos indutores de resistência sistêmica. Conseqüentemente, apresentam características que permitem pressupor que têm potencial para estabelecer e manter uma população em níveis adequados para um efetivo controle.

Este trabalho teve como objetivo averiguar a amplitude do actinomiceto selecionado como agente de biocontrole das principais enfermidades da cultura do tomateiro em casa de vegetação e em laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Investigações sobre a Amplitude e a Efetividade do Antagonista Selecionado

2.1.1. Condições do ensaio

Foi selecionado o isolado RD-01, que atuou, de modo significativo, na redução do número de lesões incitadas por *Alternaria solani* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, para estudos envolvendo outros patógenos foliares e de solo.

Sementes de tomateiro foram microbiolizadas por imersão em uma suspensão de propágulos do actinomiceto pré-selecionado, ajustada OD₅₄₀: 0.30, (embebição, 24 horas). O tratamento-controle consistiu na imersão de sementes em solução salina. Em seguida, foram plantadas em vasos de polietileno com solo comum, não estéril. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, por delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento e duas plantas para cada unidade experimental.

Este microrganismo teve sua amplitude de proteção investigada contra outros patógenos atendendo a um dos critérios de Steiner & Schonbeck (1995), que enfatizam a proteção generalizada contra uma ampla gama de patógenos (Hoffland et al., 1997; Sticher et al., 1997b; Van Loon et al., 1998).

2.2. Cultivo, preparo do inóculo e inoculação dos patógenos desafiantes

2.2.1. *Corynespora cassicola*

Em placas de Petri contendo meio V8-ágar, foi cultivado o isolado fúngico *Corynespora cassicola* por 20 dias. Placas contendo a cultura esporulante foram utilizadas para o preparo de uma suspensão de esporos em água esterilizada, raspando-se a superfície das colônias com alça de Drigalsky e,

em seguida filtrando-se em gaze. A concentração do filtrado foi ajustada para 2×10^4 conídios/ml com hemacitômetro.

A inoculação do patógeno desafiante foi procedida quando as mudas de tomateiro atingiram aproximadamente trinta dias pós-germinação ou quando da expansão completa da quinta folha.

Um dia antes da inoculação, as plantas foram submetidas a um pré-tratamento em câmara de nevoeiro, a 25°C. Imediatamente após a inoculação por atomização, as plantas foram colocadas na câmara úmida por mais 24 horas e, em seguida, deixadas em casa de vegetação, onde permaneceram até o aparecimento de sintomas típicos. Procedeu-se à avaliação pela contagem do número de lesões por folíolo.

2.2.2. *Stemphylium solani*

Um isolado de *Stemphylium solani* foi cultivado em meio de cultura V8-água durante 20 dias. Procedeu-se ao preparo de uma suspensão de esporos em água esterilizada pela raspagem da superfície da colônia com o auxílio de uma alça de Drigalsky, filtrando-se a suspensão em gaze e ajustando-se a concentração para $2,5 \times 10^3$ conídios/ml.

A inoculação do patógeno desafiante foi feita quando as mudas de tomateiro atingiram aproximadamente trinta dias pós-germinação ou quando da expansão completa da quinta folha.

Um dia antes da inoculação, as plantas foram submetidas a um pré-tratamento em câmara de nevoeiro, a 25°C. Imediatamente após a inoculação por atomização, as plantas foram colocadas na câmara úmida por mais 24 horas e, em seguida, deixadas em casa de vegetação, onde permaneceram até o aparecimento de sintomas típicos. Procedeu-se à avaliação pela contagem do número de lesões por folíolo.

2.2.3. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

O isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura 523, por 48 horas, em incubadoras a 28 °C. Preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina estéril e a concentração foi ajustada para OD₅₄₀: 0,1 pelo uso de espectrofotômetro.

A inoculação do patógeno desafiante foi procedida quando as mudas de tomateiro atingiram idade de aproximadamente trinta dias pós-germinação ou quando da expansão completa da quinta folha.

Um dia antes da inoculação, as plantas foram submetidas a um pré-tratamento em câmara de nevoeiro, a 25°C. Imediatamente após a inoculação por atomização, as plantas foram colocadas na câmara úmida por mais 24 horas e, em seguida, deixadas em casa de vegetação, onde permaneceram até o aparecimento de sintomas típicos. Procedeu-se à avaliação pela contagem do número de lesões por folíolo.

2.2.4. *Ralstonia solanacearum*

Mudas de tomateiro, obtidas em conformidade com o procedimento descrito inicialmente, foram transplantadas para infectário mantido pela equipe do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa. O infectário consiste em caixas de amianto (1,0 x 1,5 metro) e é preenchido com solo infestado com *Ralstonia solanacearum*, cujo nível populacional no solo garante uma efetiva infecção.

Foram transplantadas 50 mudas de tomateiro para o infectário e, após dez dias, foi confirmada sua eficiência pela constatação de sintomas de murcha em todas as mudas.

A parcela experimental recebeu 24 mudas espaçadas equidistantemente entre si. Foram utilizadas 6 mudas para cada tratamento, distribuídas aleatoriamente. As mudas vieram da microbiolização de sementes com

propágulos do actinomiceto selecionado, RD-01 (OD₅₄₀: 0,3), de dois actinomicetos pré-selecionados por Moura (1996), UFV-019 e UFV-113, como controle positivo, e de sementes imersas em solução salina, como tratamento controle.

As mudas foram transplantadas por meio de duas técnicas distintas:

a) Método da raiz nua: vinte dias pós-emergência, mergulharam-se as mudas com as raízes nuas em uma suspensão de propágulos de cada actinomiceto, ajustadas para uma OD₅₄₀: 0,3, durante 1 hora. Percorrido este tempo, as mudas foram transplantadas para o infectário.

b) Método direto: vinte dias pós-germinação, as mudas foram transplantadas diretamente para o infectário.

2.3. Espectro de atividade “in vitro” do actinomiceto selecionado contra patógenos da cultura

2.3.1. Inibição de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos

Na periferia de placas de Petri, contendo meio de cultura extrato de solo-água (Pramer & Schmidt, 1964), semeou-se o actinomiceto selecionado. As placas foram mantidas em incubadoras por 96 horas a 28 °C e, após, a colônia foi morta por emanções de clorofórmio depositado na tampa da placa colocada em posição invertida durante 15 minutos, seguindo-se exposição à radiação UV por 20 minutos. Verteu-se, então, uma sobre camada de BDA semi-sólido. Sobre a segunda camada, um disco de micélio de cada fungo em teste (*Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Corinespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), foi depositado no ponto oposto.

Alterações no crescimento micelial dos fungos foram acompanhadas diariamente.

A inibição do crescimento micelial foi constatada quando a colônia teve seu desenvolvimento radial interceptado por substâncias produzidas pelo actinomiceto, que difundiram-se na sobre camada.

2.3.2. Inibição na germinação de esporos

Testou-se uma suspensão de propágulos do actinomiceto pré-selecionado ($OD_{540} = 0,3$) quanto à capacidade de inibir a germinação de conídios de *Stemphylium solani* e *Corinespora cassiicola* (cultivados em meios V-8) e de *Alternaria solani* (cultivado em meio de BDA). Os controles negativo e positivo consistiram de solução salina esterilizada e de uma solução de chlorothalonil a 2g/l.

Sobre lâminas de microscopia foram colocadas gotas de 50 μ L, contendo o dobro da concentração a ser estudada, para que, com a adição de mais 50 μ L de suspensão de esporos, fossem obtidas as concentrações desejadas. A concentração de conídios de *Alternaria solani* foi de $5,0 \times 10^3$ conídios/ml, de *Stemphylium solani* e *Corinespora cassiicola* foi de 10^4 conídios/ml. Após a montagem das lâminas, estas foram mantidas em câmara úmida a 28 °C por 24 horas.

A germinação dos esporos foi determinada contando-se 100 esporos ao microscópio (40x), com três repetições. Consideraram-se germinados aqueles conídios que, o comprimento do tubo germinativo, igualou ou foi superior ao seu maior diâmetro.

2.3.3. Inibição “in vitro” da liberação de zoósporos de *Phytophthora infestans*

Empregando-se a suspensão de propágulos do actinomiceto, preparada como descrito anteriormente, estudou-se a efetividade do actinomiceto em inibir a liberação de zoósporos de *Phytophthora infestans* segundo método adaptado de Vieira *et al.* (2000). Os tratamentos-testemunha consistiram de solução salina esterilizada (controle negativo) e solução de chlorothalonil a 2g/l.

Sobre lâminas de microscopia, foram colocadas gotas de 50 μ L, contendo o dobro da concentração a ser estudada, para que, com a adição de mais 50 μ L de uma suspensão de esporângios, fossem obtidas as concentrações desejadas. A

suspensão foi ajustada para 10^4 esporângios/ml. As lâminas, mantidas em câmara úmida, permaneceram em incubadoras reguladas a 4 °C, por 3,0 horas. Após esse período, foram imediatamente transferidas para câmara de incubação regulada a 17 °C, por 24 horas, quando foi avaliado o percentual de esporângios que germinaram indiretamente.

A germinação indireta de esporângios foi verificada com 100 esporângios escolhidos ao acaso, em microscopia (40x), com três repetições, determinando assim a percentagem de esporângios que liberaram zoósporos em relação aos tratamentos controles.

2.3.4. Inibição de crescimento de fitobactérias “in vitro”

Essa inibição foi determinada utilizando-se o método da sobrecamada (Romeiro, 2001). Para tanto, 0,1 ml da suspensão de propágulos do potencial antagonista em teste foi depositado no centro da superfície de placas de Petri contendo extrato de solo-ágar, seguindo-se incubação a 30 °C, por 96 horas. Após este período, as colônias foram mortas por exposição à luz ultravioleta (254 nm), por 20 minutos. Em seguida, verteu-se uma sobrecamada de meio 523 (Kado & Heskett, 1970) semi-sólido fundente adicionado de propágulos das fitobactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*). As placas foram vedadas, mantidas em incubadoras a 28°C, e examinadas diariamente a fim de observar a formação ou não de halos de inibição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Amplitude de efetividade do actinomiceto selecionado

O antagonista selecionado como agente de biocontrole contra os patógenos fúngicos e bacterianos da parte aérea do tomateiro teve sua amplitude de efetividade confirmada (Quadro 01).

Quadro 01 - Número médio de lesões/folículo/planta causadas por diferentes patógenos na parte aérea de plantas de tomate, oriundas de sementes bacterizadas com o actinomiceto pré-selecionado

Tratamento	Patógenos		
	Cc	Ss	Xcv
Controle	1,15 a	0,98 a	4,97 a
RD-001	0,52 b*	0,51 b	3,08 b*
C.V.	31,6	45,8	25,9

Cc- *Corinespora cassiicola*; Ss- *Stemphylium solani*; Xcv- *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Médias (dez repetições) seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey (α : 0,05);

*. Nível de significância α : 0,01.

Foi observada efetividade generalizada para todos os patógenos desafiados testados, indo de encontro ao conceito de RSI e em consenso com vários autores (Steiner & Schonbeck, 1995; Sticher et al., 1997a; Van Loon et al., 1998).

Mesmo que a proteção de plantas contra patógenos por agentes bióticos, possua em evidência a separação espacial entre o antagonista e o agente fitopatogênico, a ISR não pode ser julgada como o mecanismo atuante observado, pois o agente de controle pode estar agindo diretamente sobre o patógeno ou, ainda, realizando as duas coisas ao mesmo tempo (Romeiro, 1999).

Em relação ao patógeno desafiante *Ralstonia solanacearum*, nenhum dos tratamentos mostrou-se eficiente em controlar a doença quando estes foram conduzidos de acordo com a primeira metodologia de transplante de mudas (raiz nua), provavelmente devido aos ferimentos radiculares ocasionados pelo

processo, abrindo portas de entrada para os fitopatógenos, mesmo sendo realizado o pré-tratamento em uma suspensão do antagonista como proteção.

Quando da realização da segunda metodologia de transplante de mudas para o infectário, 33,3 % das plantas oriundas de sementes microbiolizadas com propágulos dos actinomicetos pré-selecionados por Moura (1996) UFV-019 e UFV-113, mostraram-se capazes de suportar a alta infestação do patógeno no solo por mais quatro dias, após a murcha de todas as plantas do tratamento-controle, que murcharam dez dias pós-transplante e, 16,6 % das plantas do tratamento UFV-113 resistiram por até sete dias após a morte das plantas-controle.

Das plantas provenientes de sementes microbiolizadas com o actinomiceto pré-selecionado para este trabalho (RD-01), 16,6 % resistiram em até sete dias após a murcha de todas as plantas do tratamento-controle, mostrando sua eficiência, mesmo que pequena, de suportar plantas por um tempo mais prolongado em solo infestado com patógeno desafiante.

3.2. Eficiência do antagonista selecionado “in vitro”

Com relação aos possíveis mecanismos de ação, o isolado RD-01 apresentou atividade de biocontrole “in vivo” contra os patógenos citados anteriormente e, “in vitro”, mostrou ser capaz de atuar como inibidor da germinação de conídios (Gráfico 2) e de crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos da parte aérea do tomateiro (*Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola* e de *Stemphylium solani*) reduzindo em 43 % a liberação de zoósporos por esporângios de *Phytophthora infestans* (Gráfico 1 e Quadro 2). Porém, não foi eficiente, em condições gnotobióticas, em suprir o desenvolvimento de fitobacterioses, tanto do solo quanto da parte aérea da cultura do tomateiro, a saber: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e *Ralstonia solanacearum*.

Em consonância com vários autores (Ramamoorthy et al., 2000; Steiner & Schonbeck, 1995; Sticher et al., 1997a; Van Loon et al., 1998) e de acordo com

dados observados neste trabalho, podem-se observar abreviações dos possíveis mecanismos de atuação do agente microbiano em interação com a planta hospedeira, ressaltando indicativos de mais de um tipo de mecanismo de controle.

A existência de substâncias antimicrobianas produzidas “in vitro” pelo isolado RD-01, que inibiram o desenvolvimento micelial e a germinação de conídios de *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola* e de *Stemphylium solani* (Quadro 2), e a atuação do antagonista, quando em associação com o hospedeiro, para reduzir o número de lesões dos agentes fitopatogênicos descritos, evidencia a possibilidade de uma possível ação direta por produtos de caráter antibiótico produzidas pelo microrganismo, agindo no ponto de infecção onde se encontram os patógenos (Romeiro, 1999).

A ausência de produtos de natureza antibacteriana demonstrada em laboratório pelo isolado RD-01 e sua capacidade em agir como biocontrolador de doenças incitadas por fitobactérias, como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em casa de vegetação, sugerem mediação de ISR pelo actinomiceto, já que se pôde verificar sua capacidade de colonizar rizoplano de tomateiro “in vitro” e estar espacialmente separado do fitopatógeno desafiante, a ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno e a inespecificidade de proteção, mesmo não sendo generalizada, corroborando com alguns autores (Hoffland et al., 1997; Koepler et al., 1997; Luz, 1996; Mariano & Kloepper, 2000; Ramamoorthy et al., 2000; Romeiro, 1999; Steiner & Schonbeck, 1995; Sticher et al., 1997a; Van Loon et al., 1998; Zehnder et al., 2001).

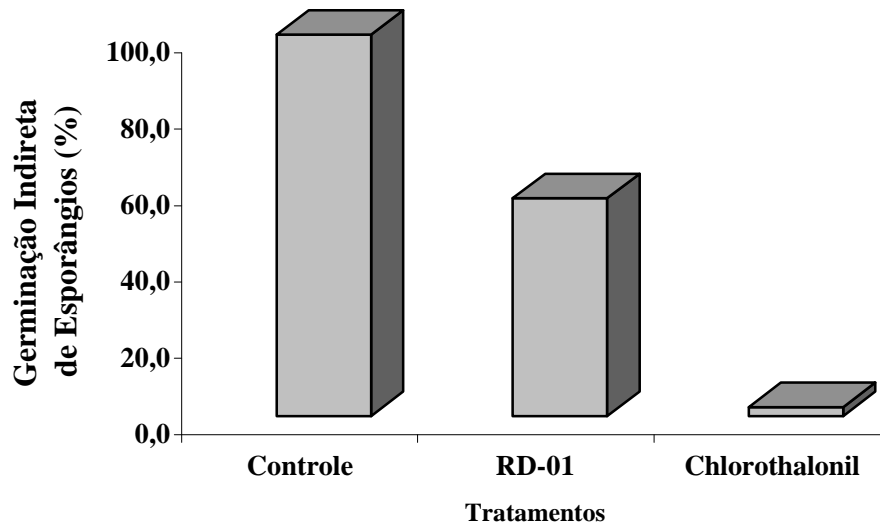


Gráfico 1 - Inibição, “in vitro”, da germinação indireta de esporângios de *Phytophthora infestans*, pelo antagonista RD-01.

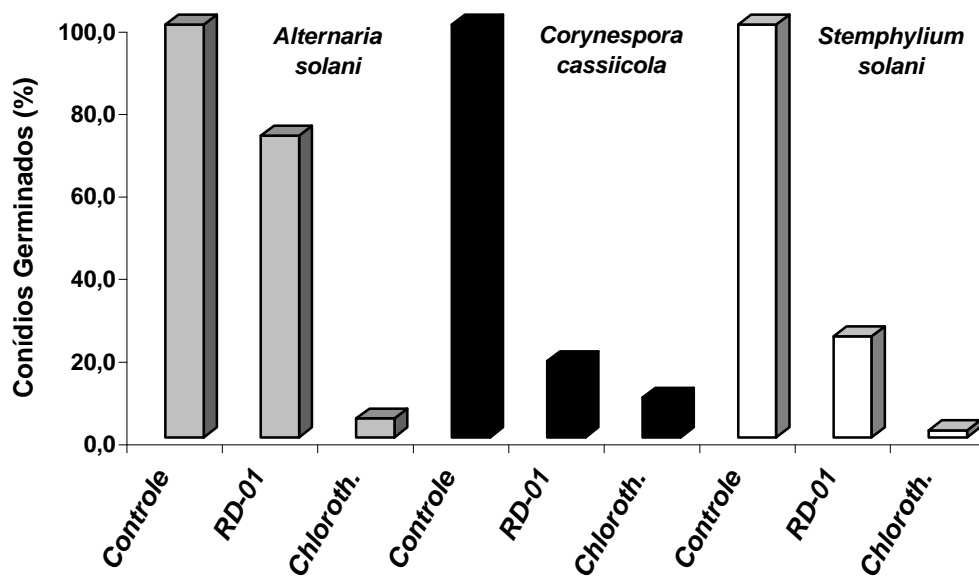


Gráfico 2 - Inibição, “in vitro”, da germinação de conídios de *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola* e de *Stemphylium solani*, pelo antagonista RD-01.

Quadro 2 - Número de conídios germinados, pertencentes a *Alternaria. solani*, *Stemphylium. solani*, *Corynespora. cassiicola*, e liberação de zoósporos em esporângios de *Phytophthora infestans*.

Tratamentos	Patógenos			
	<i>A. solani</i>	<i>C. cassiicola</i>	<i>S. solani</i>	<i>P. infestans</i>
Controle	65,66 ¹ a	38,00 a	60,00 a	28,00 a
RD-001	48,00 b	7,00 b	14,66 b	16,00 b
Chlorothalonil	3,00 c	3,66 b	1,00 b	0,66 c
C.V.	16,48	28,98	20,51	28,31
α :	0,05	0,01	0,01	0,05

1. Médias (três repetições) que possuem a mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de Tukey.

4. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N. *Plant Pathology*. 4^o ed., Academic Press, New York. 1997, 665 p
- Benhamou, N. & Belanger, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, v.14, p. 13-21, 1998
- Benhamou, N., Belanger, R. R. & Paulitz, T. C. Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* and *Phytophthora ultimum*. **Phytopathology**, v.86, p. 114-178, 1996a
- Benhamou, N., Kloepper, J. W., Quadt-Hallmann, A. & Tuzun, S. Induction of defence-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v.112, p. 919-929, 1996b
- Benhamou, N., Koeppler, J. W. & Tuzun, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultra structure and cytochemistry of the host response. **Plant**, v.204, p. 153-168, 1998
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Araújo, J. C. A., Vieira, B. A. H., Andrade, C. G. & Ferreira, E. A. Actinomicetos com características de PGPR e biocontrole da pinta-preta do tomateiro (*Alternaria solani*) por indução de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p. (Abstract), 1999
- Chester, K. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quart. Rev. Biol.**, v.8, p. 129-151, 1933
- El-Abyad, M., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R. & El-Sabbagh, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.149, p. 185-195, 1993b
- Hoffland, E., Bakker, P. A. H. M. & Van Loon, L. C. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. **Phytopathology**, v.87, p. 138, 1997
- Hurbert, J. J. & Helton, A. W. A translocated resistance phenomenon in *Prunus domestica* induced by initial infection with *Cytospora cineta*. **Phytopathology**, v.57, p. 1094-1098, 1967

- Kado, C. I. & Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 969 - 979., 1970
- Koeppler, J. W., Tuzun, S., Zehnder, G. W. & Wei, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induced systemic resistance-Historical precedence. **Phytopathology**, v.87, p. 136-137, 1997
- Kuc, J. Induced immunity to plant disease. **Bioscience**, v.32, p. 854-60, 1982
- Luz, W. C. Rizobacterias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p. 1-49, 1996
- M'Piga, P., Belanger, R. R., Paulitz, T. C. & Benhamou, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiology Molecular of Plant Pathology**, v.50, p. 301-320, 1997
- Mariano, R. L. R. & Kloepper, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p. 121-137, 2000
- Mello, I. S. & Azevedo, J. L. *Controle Biológico* (Mello, I. S. & Azevedo, J. L., Eds.), v.2, Embrapa. 2000, 387 p
- Miller, H. L., Henken, G. & Van Veen, J. A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p. 656-660, 1989
- Moura, A. B. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. D.S, UFV. 1996, 112p.
- Murphy, J. F. & Zehnder, G. W. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. **Plant Disease**, v.84, p. 779-784, 2000
- Nordlund, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17 (2), p. 35-44, 1996
- Pascholati, S. F. & Leite, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p. 1-50, 1994
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P. J. & Van Loon, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.10, p. 1571-1580, 1998

- Pramer, D. & Schmidt, E. L. *Experimental soil microbiology*, Burgess Publishing Company, Saint Paul. 1964, p
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. & Samiyappan, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p. 1-11, 2000
- Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S. & Kloepper, J. W. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant Disease**, v.80, p. 891-894, 1996
- Romeiro, R. S. *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*, 56, UFV, Viçosa. 1999, 45 p
- Romeiro, R. S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas* (Romeiro, R. S., Ed.), UFV, Viçosa, MG. 2001, 279 p
- Romeiro, R. S., Moura, A. B., Matsuoka, K. & Fernandes, M. C. Actinomycetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia solanacearum*) and growth promotion after seed microbialization. **89^a Annual Meeting of The American Phytopathological Society. Rochester, New York, USA**, v. August, p. 9-13, 1997
- Ross, A. F. Systemic acquired resistance by localized virus infection in plants. **Virology**, v.14, p. 340-358, 1961
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Orgonovi, G. E. & Merli, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strain from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 2691-2693, 1992
- Scheffer, R. J. Biological control of Dutch elm disease by *Pseudomonas* species. **Annals of Applied Biology**, v.103, p. 21-26, 1983
- Steiner, U. & Schonbeck, F. (1995). Induced disease resistance in monocots. In *Induced Resistance to Disease in Plants* (Hammerschmidt, R., ed.), Vol. 4, pp. 86-110. Dordrech: Kluwer Academic Pub.
- Sticher, L., Mauch Mani, B. & Metraux, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p. 235-270, 1997a
- Sykes, G. & Skynner, F. A. *Actinomycetales: characteristics and practical importance*, Academic Press, London. 1973, 339p. p

- Tuzun, S. & Kuc, J. (1991). Plant immunization: an alternative to pesticides for control of plant disease in green house and field. In *The Biological Control of Plant Diseases* (Bay-Peterson, J., ed.), pp. 30-40. Food and Fertilizer Technology Centre, Taiwan.
- Van Loon, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p. 753-65, 1997
- 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. 453-83, 1998
- Vieira, B. A. H., Romeiro, R. S., Mizubuti, E. S. G. & Deuner, C. C. Ação in vitro de agentes bióticos e abióticos de controle de algumas fases do ciclo de *Phytophthora infestans*. **Summa Phytopatológica**, v.26, n.1, p. 142 (Abstract), 2000
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **Journal of European Molecular Biology Organization**, v.8, p. 351-358, 1989
- Wei, L., Koepller, J. W. & Tuzun, S. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, p. 221-224, 1996
- Zdor, R. E. & Anderson, A. J. Influence of root colonizing bacteria on the defence responses in bean. **Plant Soil**, v.140, p. 99-107, 1992
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J. & Kloepper, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 39-50, 2001

ACTINOMICETOS COMO POSSÍVEIS AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATEIRO

RESUMO

Sementes de tomate (Santa Cruz 'Kada') foram microbiolizadas com propágulos de cada um dos 117 actinomicetos, obtidos de diferentes amostragens de solo de rizosfera e de rizoplano de tomateiro e semeadas em solo não tratado em casa de vegetação. Para cada tratamento foram utilizadas 3 repetições, sendo 2 plântulas por recipiente. Trinta dias após a emergência, procederam-se às mensurações correspondentes à altura de plantas, aos pesos das matérias fresca e seca, à contagem do número de folíolos e de folhas completamente expandidas. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e do tratamento-controle, apesar do actinomiceto SON-018 ter se destacado, para o caso de todas as variáveis observadas.

ACTINOMYCETES AS PLANT GROWTH-PROMOTING AGENTS IN TOMATO

ABSTRACT

A set of 117 isolates of actinomycetes was obtained from samples of rhizospheric soil and from root cuttings of tomato by serial dilution of water extracts followed by plating dilutions in soil extract-agar medium. Tomato seeds (Santa Cruz 'Kada') were microbiolized by immersion overnight in a turbid propagule suspension of every actinomycete and next seeded in pots containing non-sterile soil, in a greenhouse. For each treatment there were used three replicates, consisting each replicate in a pot with 2 plants. Thirty days after seed germination, growth promoting parameters such as plant height, plant fresh and dry weight as well as number of leaflets and leaves were estimated. No significant differences were detected in the ability of actinomycetes to promote growth in relation to control plants in spite of the fact that the actinomycete SON-018 presented a visual better performance if compared to the other isolates under investigation.

1. INTRODUÇÃO

Com o intuito de reduzir o uso excessivo de pesticidas e evitar danos maiores, principalmente a micro biota do solo, estão sendo empreendidas práticas alternativas de manejo, como a microbiolização de sementes com rizobactérias para o controle de doenças incitadas por patógenos de solo e para promoção de crescimento e rendimento de plantas (Benizri *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1996; Kloepper *et al.*, 1991; Luz, 1993; Luz, 1996; Luz, 2001; Ramamoorthy *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 2001).

Pesquisas referentes à promoção de crescimento de plantas usando-se rizobactérias não rizobiais vêm sendo conduzidas, desde 1885, pelos governos da Rússia e da Ucrânia, com microrganismos como *Azotobacter choococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies de *Bacillus* (Luz, 1996). O reconhecimento dos efeitos benéficos da associação plantas-rizobactéria no desenvolvimento de plantas vem sendo observado desde 1904, por Hiltner, ao descrever numerosos microrganismos colonizando a porção do solo circundado pelas raízes, região denominada de rizosfera (Cattelan & Hartel, 2000; Mahaffee & Kloepper, 1994).

Nos anos 30, continuaram as investigações sobre inoculantes bacterianos e a promoção de crescimento vegetal, principalmente usando espécies de *Bacillus* e *Arthrobacter* (Brown, 1974). Mas foi somente nos anos 50 que microrganismos não simbiotes foram utilizados na agricultura, aumentando de 10 a 20 % no rendimento das colheitas pela inoculação de mais de 35 mil hectares de terras na Rússia (Luz, 1996; Mahaffee & Kloepper, 1994).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são organismos procariotas que se propagam próximo às raízes, estimulados pelos exsudatos radiculares, promovendo o desenvolvimento vegetal através de diferentes mecanismos (Cattelan, 1999; Cattelan & Hartel, 2000).

O crescimento de plantas promovido por rizobactérias as torna mais vigorosas, mais resistentes a estresse e aumenta a produção provavelmente devido a um conjunto de fatores, como, promoção direta de crescimento pela

produção de fito-hormônios (El-Abyad *et al.*, 1993b), incluindo auxinas, citocininas, giberelinas e etileno, aumento da fixação de nitrogênio da atmosfera, aumento da permeabilidade das raízes, o que estimula o aumento da absorção de nutrientes (Brown, 1974; Enebak *et al.*, 1998; Patten & Glick, 1996), bem como a possibilidade de serem endófitas, de produzirem metabólitos (Sardi *et al.*, 1992) e solubilizarem fosfato e outros nutrientes (Rodríguez *et al.*, 2000).

Indiretamente as rizobactérias podem promover o crescimento de plantas afetando a fixação simbiótica de nitrogênio, aumentando o número de nódulos e a eficiência de nodulação por agentes fixadores de N₂, em relações sinérgicas (Polonenko *et al.*, 1987). Podem também atuar como agentes de biocontrole, mantendo o solo supressivo, inibindo patógenos secundários da rizosfera (Suslow & Schroth, 1982) ou participando de processos de indução de resistência sistêmica, diminuindo ou prevenindo efeitos deletérios de um ou mais microrganismos fitopatogênicos (Pan *et al.*, 1999).

Outros mecanismos de ação das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção são propostas como a detoxificação do solo em volta das raízes (Walton & Anderson, 1990), aderências das rizobactérias às hifas dos patógenos por interações de lectinas, que inibem o crescimento adicional do fungo (Nelson *et al.*, 1986), e a inativação de estimulantes de propágulos de patógenos presentes no solo (Van Dijk, 1995).

Dessa forma, os actinomicetos podem exercer competição com a microflora adjacente da rizosfera, podendo estabelecer e persistir nas raízes de plantas cultivadas, sendo esperado um certo nível de especificidade na associação rizobactéria-hospedeiro (Kloepper, 1996; Romeiro, 1999), resultando em plantas maiores, mais saudáveis, vigorosas e mais produtivas (Chen *et al.*, 1996).

(Hadas & Okon, 1987), ao trabalharem com sementes de tomateiro microbiolizadas com *Azospirillum brasiliense*, em solo não esterilizado, investigaram os efeitos diretos de seus componentes no desenvolvimento radicular, encontrando incremento no alongamento das raízes e no aumento de raízes secundárias, decrescendo o tempo para a formação do sistema radicular, como resultados.

(Kloepper et al., 1991) utilizaram sementes microbiolizadas com bactérias fluorescentes e com *Serratia spp.*, obtendo acréscimo no peso da matéria seca da parte aérea das plantas e das raízes de tomateiro, em casa de vegetação, utilizando solo não-esterilizado. (Peixoto et al., 1995), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como inoculantes de sementes e/ou substrato, verificaram aumentos de até 52,5 % na emergência e de até 61,1 % no peso da matéria seca de tomateiro semeadas em solos esterilizados ou não, em casa de vegetação.

Similarmente, (El-Abyad et al., 1993b) constataram melhora na emergência de sementes de tomateiro, maior desenvolvimento radicular pelo aprofundamento de 20 % da raiz principal e aumento de 90 % do peso da matéria seca, em experimentos com PGPR visando ao controle de *P. solanacearum* pelo uso do antagonista *Streptomyces pulcher*, que apresentava atividade *in vitro* contra o patógeno.

Existem vários relatos de promoção de crescimento de tomateiro mediados por actinomicetos, aliados ao controle de diferentes bacterioses (Carrer Filho et al., 2001; Carrer Filho et al., 2001a; Carrer Filho et al., 1999; Kloepper et al., 1991; Mantovanello & Melo, 1994; Moura, 1996; Moura et al., 1996; Romeiro et al., 1997a; Romeiro et al., 1997b).

Este trabalho objetivou, investigar o potencial de promoção de crescimento de tomateiro mediado pelos actinomicetos isolados de diferentes solos de rizosfera e de rizoplane de plantas de tomateiro, quando utilizados para microbiolização de sementes, conduzida em casa de vegetação, em solo não esterilizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação dos Actinomicetos como Prováveis Agentes Promotores de Crescimento de Plantas de Tomateiro

Os actinomicetos, potenciais promotores de crescimento de plantas, foram previamente cultivados em tubos contendo meio extrato de solo-ágar (Pramer &

Schmidt, 1964) em temperatura de 30 °C, por 96 horas. Sementes de tomate da variedade Santa Cruz `Kada´ foram microbiolizadas por embebição, 30 °C, por 24 horas, em uma suspensão de propágulos preparados a partir de solução salina (Na Cl 0,85 %) estéril, de cada um dos 117 actinomicetos.

Procedeu-se ao plantio, em vasos de 0,4 litro, com solo não-esterilizado, em casa de vegetação, com três repetições para cada tratamento, sendo cada parcela constituída por duas plantas por vaso. Sementes imersas em solução salina estéril foram utilizadas como testemunha. A avaliação foi realizada trinta dias após a germinação, avaliando-se altura de plantas, número de folhas e de folíolos, e pesos das matérias fresca e seca da parte aérea.

2.1.1. Altura de plantas e número de folhas e de folíolos por planta

Mediu-se a altura das plantas tomando-se, como padrão, a distância do ponto de inserção das folhas cotiledonares até a gema apical. Foram contados o número de folhas verdadeiras, completamente expandidas, e o número de folíolos por planta.

2.1.2. Peso das matérias fresca e seca

As plantas foram seccionadas no ponto de inserção das folhas cotiledonares e imediatamente pesadas (peso da matéria fresca) e, então, submetidas à secagem a 70 °C, por 72 horas, e novamente pesadas (peso da matéria seca). Os resultados foram expressos como o peso médio das plantas em cada medição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 117 isolamentos de actinomicetos utilizados, nem um dos representantes diferiu significativamente, por análises estatísticas, ao se compararem às médias provenientes das variáveis altura de plantas, número de

folha e de folíolo por planta e pesos da matéria fresca e seca. Observou-se que houve aumento de 10,5 % na altura das plantas, de cerca de 20,8 % e 23,7 % nos pesos da matéria fresca e seca, respectivamente, e de 15,4 % no total de folhas completamente expostas, conferidas pelo actinomiceto SON-018 quando usado para bacterização de sementes de tomate.

A não-manifestação diferenciada, promovida pelo método estatístico em relação ao comportamento dos parâmetros relacionados com a promoção de crescimento aqui referidos, provavelmente é intitulada pelo fato de ter sido pequena a amostra dos tratamentos, que tiveram suas médias provenientes de apenas três repetições, e pelo curto período de desenvolvimento das plântulas antes das mensurações.

Pode-se também concluir que houve algum tipo de competição entre as plantas, já que foram colocadas duas plantas em um recipiente de 0,40 litro.

De acordo com vários autores (Benizri et al., 2001; Luz, 1996; Mariano & Romeiro, 1999; Oberhansli *et al.*, 1991; Ramamoorthy et al., 2000; Romeiro, 1999; Van Loon *et al.*, 1998), são raros os casos de um mesmo agente bacteriano apresenta, ao mesmo tempo, características de biocontrole e de promoção de crescimento.

Investigações mais detalhadas sobre os actinomicetos como potenciais promotores de crescimento são necessárias antes de qualquer especulação quanto ao desenvolvimento de plantas.

BIBLIOGRAFIA

- Benizri, E., Baudoin, E. & Guckert, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**,v.11, p. 557-574, 2001
- Brown, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**,v.12, p. 181-97, 1974
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Garcia, F. A. O., Moura, A. B. & Batista, U. G. Seleção de Actinomicetos Visando Biocontrole da Mancha Bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) por Indução de Resistência Sistêmica. **Summa Phytopathologica**,v.27, nº 1, p. 105 (Abstract), 2001
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Garcia, F. A. O., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Deuner, C. C. & Batista, U. G. Seleção de Actinomicetos como Promotores de Crescimento e como Indutores de Resistência Sistêmica em Tomateiro à Mancha Bacteriana Pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**,v.26, p. (Abstract), 2001^a
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Araújo, J. C. A., Vieira, B. A. H., Andrade, C. G. & Ferreira, E. A. Actinomicetos com Características de PGPR e Biocontrole da Pinta- Preta do Tomateiro (*Alternaria solani*) por Indução de Resistência. **Fitopatologia Brasileira**,v.24, p. (Abstract), 1999
- Cattelan, A. J. *Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal*, Embrapa Soja, Londrina. 1999, 36 p
- Cattelan, A. J. & Hartel, P. G. (2000). Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In *Tópicos em Ciência do Solo*, Vol. 1, pp. 213-234. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa.
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. & Kloepper, J. W. (1996). The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In *Management of Soil Borne Diseases* (Utkhede, R. S. & Gupta, V. K., eds.), pp. 164-184. Kalyani, New Delhi.
- El-Abyad, M., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R. & El-Sabbagh, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**,v.149, p. 185-195, 1993b

- Enebak, S. A., Wei, G. & Kloepper, J. W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**,v.44, p. 139-44, 1998
- Hadas, R. & Okon, Y. Effect of *Azospirillum brasiliense* inoculation of root morphology and respiration in tomato seedling. **Biol. Fertil. Soils**,v.5, p. 241-247, 1987
- Kloepper, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**,v.26, p. 406-409, 1996
- Kloepper, J. W., Zablutowicz, R. M., Tipping, E. M. & Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In *The rhizosphere and plant growth* (Keister, D. L. & Cregan, P. B., eds.), pp. 315-326. Kluwer Academic Publishers.
- Luz, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**,v.1, p. 33-77, 1993
- Luz, W. C. Rizobacterias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**,v.4, p. 1-49, 1996
- Luz, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**,v.26, p. 16-20, 2001
- Mahaffee, W. F. & Kloepper, J. W. (1994). Applications of plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems* (Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. & Grace, P. R., eds.), pp. 23-31. CSIRO, Melbourne.
- Mantovanello, C. M. & Melo, I. S. Isolamento e seleção de rizobacterias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**,v.20, p. 123-126, 1994
- Mariano, R. L. R. & Romeiro, R. S. (1999). Indução de resistência sistêmica mediada por rizobacterias promotoras de crescimento de plantas. In *Controle Biológico* (Soares de Melo, I. & Lúcio de Azevedo, J., eds.), Vol. 02, pp. 305-324. EMBRAPA-Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.
- Moura, A. B. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. D.S, UFV. 1996, 112p.

- Moura, A. B., Romeiro, R. S. & Neves, D. M. S. Actinomicetos com atividade semelhante a PGPR em plantas de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p. 337. (abstract), 1996
- Nelson, E. B., Chao, W. L., Norton, J. M., Tash, G. T. & Harman, G. E. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. **Phytopathology**, v.76, p. 327-35, 1986
- Oberhansli T., Dèfago, G. & Haas, D. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. **Journal of General Microbiology**, v.137, p. 2273-2279, 1991
- Pan, B., Bai, Y. M., Leibovitch, S. & Smith, D. L. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. **European Journal of Agronomy**, v.11, p. 179–186, 1999
- Patten, C. L. & Glick, B. R. Bacterial biosyntheses of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p. 207-20, 1996
- Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., Michereff, S. & Oliveira, S. M. A. Ação antagônica de *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. **Summa Phytopathologica**, v.21, p. 219-24, 1995
- Polonenko, D. R., Scher, F. M., Kloepper, J. W., Singleton, C. A., Laliberte, M. & Zaleska, I. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybeans roots by *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p. 498-503, 1987
- Pramer, D. & Schmidt, E. L. *Experimental soil microbiology*, Burgess Publishing Company, Saint Paul. 1964, p
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. & Samiyappan, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p. 1-11, 2000
- Rodríguez, H., Gonzalez, T. & Selman, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v.84, p. 155–161, 2000
- Romeiro, R. S. *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*, 56, UFV, Viçosa. 1999, 45 p

- Romeiro, R. S., Leite, R. S. V., Brito, R. P., Matsuoka, K. & Barbosa, J. G. Experimental evidence of induced systemic resistance in tomato to *P. syringae* pv. *tomato* after seed microbialization with selected rhizobacteria. **Phytopathology**, v.87, p. 183. (Abstract), 1997a
- Romeiro, R. S., Moura, A. B., Matsuoka, K. & Fernandes, M. C. Actynomicetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia solanacearum*) and growth promotion after seed microbialization. **89^a Annual Meeting of The American Phytopathological Society. Rochester, New York, USA**, v. August, p. 9-13, 1997b
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Orgonovi, G. E. & Merli, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strain from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 2691-2693, 1992
- Suslow, T. V. & Schroth, N. Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v.72, p. 199-206, 1982
- Van Dijk, K. Seed exudate stimulant inactivation by *Enterobacter cloacae* and its involvement in the biological control of *Phyitium ultimum*. Tese de doutorado, Cornell University. 1995, 96p.
- 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. 453-83, 1998
- Walton, B. T. & Anderson, T. A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 1012-6, 1990
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J. & Kloepper, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 39-50, 2001

ACTINOMICETOS PRÉ-SELECIONADOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE E COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

RESUMO

Mudas de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram transplantadas para o campo, 20 dias após o semeio em solo não tratado. O ensaio foi conduzido com quatro blocos, sendo cinco tratamentos, a saber: químico, consistindo de pulverizações bisemanais com chlorothalonil (2g/l); rizoplano, plantas oriundas de sementes microbiolizadas com propágulos do actinomiceto pré-selecionado RD-01 ($OD_{540} = 0,3$); filoplano, efetuado pela pulverização semanal da parte aérea com uma suspensão de propágulos do actinomiceto pré-selecionado SON-17 ($OD_{540} = 0,3$); rizo/filo, plantas advindas de sementes microbiolizadas com propágulos do actinomiceto pré-selecionado RD-01 e que também tiveram a parte aérea colonizada, semanalmente, com propágulos do actinomiceto pré-selecionado SON-17 e o tratamento-controle. Avaliou-se o progresso da pinta-preta (*Alternaria solani*) e da mela (*Phytophthora infestans*), estimando-se a percentagem da área foliar lesionada, encontrando-se diferença significativa entre os tratamentos pela análise da área abaixo da curva de progresso de doença. Apesar do controle químico ter sido mais efetivo, os tratamentos pela colonização do filoplano e pela microbiolização de sementes com os actinomicetos SON-17 e RD-01, respectivamente, diferiram estatisticamente do tratamento-controle, quando da avaliação da AACPD causada por *Alternaria solani*, revelando sua potencialidade como medida passível de ser utilizada em procedimentos de manejo integrado.

PRE-SELECTED ACTINOMYCETES AS BIOCONTROL AGENTS AND AS GROWTH PROMOTERS OF TOMATO PLANTS IN THE FIELD

ABSTRACT

Twenty-day old tomato seedlings were moved to field in an experiment to confirm the ability of bacterial biocontrol agents that were previously selected for this purpose. The experiment was set in randomized blocks, being four blocks and five treatments as follows: a) Chemical treatment only, consisting in sprayings (twice a week) with the fungicide chlorothalonil (2g/l); b) Plants arisen from seeds microbiolized with propagules ($OD_{540} = 0,3$) of the pre-selected actinomycete RD-01; c) Colonization of the phylloplane of non-microbiolized plants by spraying them (weekly) with a propagule suspension of the previously selected actinomycete SON-17 ($OD_{540} = 0,3$); d) Spraying (weekly) the phylloplane of plants (arisen from microbiolized seeds as in **b**) with a propagule suspension of the previously selected actinomycete SON-17 ($OD_{540} = 0,3$) and e) Control plants neither microbiolized nor sprayed with cell suspensions of microorganisms. The progress of late blight disease (*Alternaria solani*) as well as of early blight (*Phytophthora infestans*) were monitored by visual inspection by using a panel of evaluators that estimated the percentage of infected leaf area and concluded that there were significant differences among treatments as far as the area below the disease progress curve (AACPD) is concerned. As expected, the chemical treatment proved to be the best one. Nevertheless, by examining the AACPD, it is possible to conclude that treatments (b), (c) and (d) differed from the control (e) for late blight. Results demonstrate that if it is not possible to get rid of chemical sprays totally it might, at least, be feasible to reduce the number of chemical sprays by using selected biocontrol agents instead.

1. INTRODUÇÃO

Os altos custos ambientais e econômicos decorrentes do uso indiscriminado de pesticidas na agricultura têm demandado num maior esforço de pesquisa direcionada para o desenvolvimento de sistemas de controle de pragas e doenças envolvendo agentes biológicos (Mahaffee & Kloepper, 1994; Mariano & Kloepper, 2000).

Uma das estratégias de manejo que não causam maiores danos ao meio ambiente, e que muito vêm se destacando no Brasil e no mundo, é o uso de rizobactérias como agentes de biocontrole e promotores de rendimento de plantas (Benizri et al., 2001; Brown, 1974; Carrer Filho et al., 2001a; Carrer Filho et al., 1999; Chen et al., 1996; Dashti et al., 1998; Handelsman & Stabb, 1996; Kloepper et al., 1991; Luz, 1993; Luz, 2001; Mahaffee & Kloepper, 1994; Moura et al., 1996; Romeiro et al., 1997; Silva & Romeiro, 2001; Velazhahan et al., 1999; Zdor & Anderson, 1992; Zehnder et al., 2001).

Em conformidade com (Kloepper et al., 1991), uma das formas mais simples de se dispensarem PGPRs em plantas é pela microbiolização de sementes, que consiste na aplicação de microrganismos vivos às sementes ou em órgãos propagativos, como ramos, tubérculos e raízes (Mariano & Kloepper, 2000). A microbiolização tem vários objetivos como fixação de N₂, melhoria da absorção de nutrientes, biocontrole de patógenos, promoção do crescimento de plantas através do aumento da taxa de germinação e do vigor das sementes (Luz, 1993; Van Loon et al., 1998; Zehnder et al., 2001).

A aplicação mais prática conhecida internacionalmente de um microrganismo para o controle biológico, através do tratamento de sementes, é o controle da galha da coroa em rosáceas incitada por *Agrobacterium tumefaciens*, por meio do isolamento não-patogênico de *Agrobacterium radiobacter* K-84 (Donner et al., 1993; Kerr, 1972), fundamentado pela ação da bacteriocina denominada Agrocin-84, produzida por um plasmídeo (pAgK84), que inibe o crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*.

Um isolado, melhorado através da tecnologia de DNA recombinante, foi desenvolvido com o plasmídeo pAgK1026, uma forma modificada que retém a produção de agrocin, de modo a excluir a possibilidade de recombinação com o patógeno através da desativação de genes que codificavam para a conjugação (Jones et al., 1988). O isolamento K-1026 de *Agrobacterium radiobacter* é à base do produto Nogall[®], muito utilizado na Austrália como um bioprotetor para uso geral.

Espécies de *Bradirhizobium* (*Rhizobium*) têm sido usadas, há vários anos, no tratamento de sementes de leguminosas, de modo a aumentar a fixação de nitrogênio. Espécies de *Azospirillum* e *Azotobacter* também têm sido pesquisadas com os mesmos objetivos (Brown, 1974). *Penicillium bilaji* tem sido aplicado como tratamento de sementes, melhorando a fixação de fósforo em trigo e canola, atuando como solubilizador de fosfato (Kucey, 1987; Kucey & Leggett, 1989).

Vários produtos comerciais com base em rizobactérias selecionadas, tanto para promoção de crescimento como para biocontrole, existem em disponibilidade no mercado, a saber: Gatrol-A[®] e Agrocin[®] (*Agrobacterium radiobacter*, estirpe K84) e Nogall[®] (*A. radiobacter*, estirpe K1026) para o controle de *A. tumefaciens* em rosáceas e tomate (Kerr, 1972), Quantum-4000[®] (*Bacillus subtilis*, estirpe GB03), Kodiak[®] e Kodiak[®] plus (*Bacillus subtilis*, estirpe GB03 melhorada) para o controle de *Fusarium graminearum* e *Rhizoctonia*, principalmente nas culturas de trigo e milho (Chang & Kommedahl, 1968), YIB[®] (*Bacillus* spp.) (Chen et al., 1996), Dagger G[®] (*Pseudomonas fluorescens*), efetivo principalmente contra fungos que atacam trigo, a saber, *B. sorokiniana* e *G. graminis* var. *tritici* (Luz, 1996), usados no tratamento de sementes de algodoeiro e eficientes no controle de *Pythium ultimum* e de *R. solani* nessa cultura (Howell & Stipanovic, 1979; Howell & Stipanovic, 1980), e *Erwinia carotovora* em batata (Kloepper et al., 1980), e o Mycostop[®] (*Streptomyces griseoviridis*, estirpe K61), produzido pela Companhia Kemira Agro Oy, é comercializado desde 1990 na Finlândia e registrado em vários

países, como Estônia, Hungria, Estados Unidos, Chile, Islândia e Noruega (Luz, 1996).

No Brasil, nenhum destes produtos está disponível no mercado. Entretanto, muito destes e outros agentes são utilizados comercialmente, ainda que em pequena escala, muitas vezes multiplicados pelos próprios usuários, como discutido por Bettiol (1996). Muitos estudos ainda estão em estágio de desenvolvimento, utilizando agentes de controle biológico, como *Bacillus subtilis* para o controle da ferrugem em café e em feijão e para o controle de míldio pulverulento em pepino (Bettiol, 1996).

Wei et al. (1996), utilizando sementes de pepino microbiolizadas com PGPR e encharcando o solo durante o transplante, conseguiu reduzir os níveis de severidade da mancha-angular incitada por *P. syringae* pv. *lachrymans* e da antracnose (*Colletotrichum. orbiculare*) em três ensaios de campo, para um período de dois anos. Em todas as investigações, obtiveram um aumento significativo na promoção de crescimento das plantas e uma melhora na produtividade da cultura.

Chen et al. (1996) relatam experiências, na Republica Popular da China, com o uso rotineiro de rizobactérias como promotoras de crescimento e ativadoras de defesa de plantas, desde a década de 80, como prática agrônômica no manejo de pragas e doenças, através da microbiolização de sementes com propágulos de YIB (Yield-Increasing Bactéria), termo usado como sinônimo para PGPR. Relatam os autores que o governo chinês encarrega-se da distribuição de cerca de 3.000 toneladas de formulações de células de rizobactérias para serem utilizadas em 35.000.000 de hectares de plantio.

Zehnder et al. (2001) investigaram a indução de resistência em Tomato Mottle Virus (ToMoV) em campo durante as safras de outono de 1997 e de outono e primavera de 1998 na Flórida. Os resultados demonstraram que o tratamento de sementes pode promover proteção em condições naturais, fato também observado por Murphy & Zehnder (2000).

Conforme relato de Kenney et al. (1999), um outro produto que está em pleno desenvolvimento, chamado de LS213, contém esporos de *Bacillus subtilis*

estirpe GB03 e de *Bacillus amyloliquefaciens* estirpe IN937 como a base da formulação industrial. O produto revelou, em casa de vegetação, sua potencialidade para promoção de crescimento de tomate, pepino e fumo e, em campo, exibiu significativa proteção contra nematóides e antracnose em pepino e contra mancha bacteriana em tomate.

São vários os mecanismos de controle passíveis pelo uso de PGPR (Shoda, 2000), podendo atuar como competidores (nicho e nutrientes), bem como agir como indutores de resistência sistêmica em plantas (ISR).

Este trabalho teve como objetivo investigar a potencialidade de microrganismos antagonistas pré-selecionados em casa de vegetação, como agentes de biocontrole e de promoção de rendimento de plantas de tomateiro em campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições do ensaio

Sementes de tomate (Santa Cruz Kada) microbiolizadas por meio de uma suspensão de propágulos do actinomiceto pré-selecionado RD-01 e outro actinomiceto, SON-17, pré-selecionado em trabalho paralelo a este, como residente de filoplano, foram os microrganismos utilizados.

Esses antagonistas foram cultivados e mantidos em meio extrato de solo-ágar (Pramer & Schmidt, 1964). O microrganismo actinomiceto RD-01 foi isolado em raiz de tomateiro doente cultivado em sistema convencional. Já o actinomiceto SON-17 foi isolado em rizosfera de tomateiro mantido em sistema orgânico.

O ensaio foi instalado em uma área experimental do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e conduzido no período de dezembro de 2001 a fevereiro de 2002. A área possui um histórico de ocorrências de doenças em tomateiro, já que se faz o plantio de tomate todo o ano no local,

além do de batata e outras solanáceas. O solo onde foi instalado o experimento possui as características mostradas no Quadro 1.

Segundo as análises, o solo é do tipo argiloso, apresenta pH médio, com teores médios de fósforo disponível e baixo de potássio trocável, com bons teores de cálcio e de magnésio.

O experimento, com delineamento em blocos casualizados, foi realizado em quatro blocos e cinco tratamentos, com cinco plantas formando cada parcela. Os tratamentos foram representados por mudas de tomate da variedade S^{ta} Cruz 'Kada' oriundas de sementes microbiolizadas por propágulos do actinomiceto RD-01, pela colonização do filoplano com actinomiceto SON-17 e pelo uso de tratamento químico com chlorothalonil. A testemunha (controle) não recebeu nenhuma manipulação.

Seguem-se os seguintes tratamentos:

Rizoplano: plantas oriundas de sementes microbiolizadas com propágulos do actinomiceto pré-selecionado RD-01.

Filoplano: plantas originárias de sementes não microbiolizadas, cuja parte aérea foi colonizada por meio de pulverizações semanais, com propágulos do actinomiceto pré-selecionado SON-17.

Rizo/Filoplano: plantas advindas de sementes microbiolizadas com propágulos do actinomiceto pré-selecionado RD-01, cuja parte aérea foi colonizada, semanalmente, com propágulos do actinomiceto pré-selecionado SON-17.

Químico: plantas sem nenhum tratamento prévio, pulverizado com chlorothalonil a 2g/litro, bi semanalmente.

Controle: plantas sem qualquer tipo de tratamento.

Nos tratamentos Rizoplano e Rizo/Filoplano, a microbiolização procedeu-se por meio de uma suspensão de propágulos ajustada $OD_{540} = 0,3$. Nos tratamentos Filoplano e Rizo/Filoplano, as colonizações das partes aéreas foram realizadas por pulverizações de uma suspensão de propágulos em concentração $OD_{540} = 0,2$.

Quadro 1 - Resultado da análise do solo realizado dez dias antes do transplante das mudas de tomateiro para o campo.

Identificação	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺	SB	CTC(t)	CTC(T)	V	Argila
	H ₂ O	mg/dm ³		Cmol _c /dm ³						%	%	
AMSOLO	5,5	9,5	36	3,8	1,0	0,1	4,6	4,89	4,99	9,49	52	40

2.2. Condições de manejo

Procedeu-se à aração seguida de gradagem, com incorporação ao solo de plantas de Juá Bravo (*Solanum carolinenses*), que se encontravam no local. O transplante das mudas de tomateiro para o campo ocorreu 20 (vinte) dias após a emergência das plantas em solo não-esterilizado, em casa de vegetação. Cinco dias após o transplante, verteram-se 50 ml de uma suspensão de propágulos do actinomiceto RD-01 (OD₅₄₀: 0,2) em cada cova de plantas previamente microbiolizadas.

As plantas foram conduzidas verticalmente, com o espaçamento de 1,00 x 0,30m (Boff et al., 1991a). As plantas foram conduzidas com duas hastes, sendo a poda de caules realizada semanalmente.

A irrigação utilizada foi à aspersão e as adubações de transplante e de cobertura foram implementadas em função de análise química do solo.

2.3. Quantificação das doenças

A incidência de pinta-preta (*Alternaria solani*) e de mela (*Phytophthora infestans*) foram avaliadas, semanalmente, em todas as plantas. A severidade da pinta-preta foi estimada pelo uso de escalas diagramáticas com diferentes percentagens de área foliar lesionada (Boff et al., 1991b). Já para a incidência de mela (*Phytophthora infestans*), dois avaliadores foram utilizados para estimar a percentagem da área foliar lesionada, utilizado o programa SeverityPro[®] (Nutter & Litwiller, 1998) para o treinamento da acurácia e da precisão.

Avaliou-se a área foliar lesionada pela pinta-preta semanalmente e, pela mela, duas vezes por semana, obtendo a curva do progresso das doenças como a AACPD (área abaixo da curva do progresso de doença).

Foram avaliados juntamente com a severidade das doenças a altura de plantas, o número de folhas verdadeiras completamente expostas e a produção de frutos como possíveis parâmetros indicadores de crescimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com análise química do solo, não foi realizada adubação de transplante das mudas para o campo, dadas as características do solo. Vinte e quatro dias após o transplante foram efetivados adubação de cobertura com 4-14-8 (N-P-K) devido à observação de bronzeamento das folhas no tratamento-controle.

O progresso de doenças foi acompanhado e quantificado, conforme demonstrado nas Figuras 1 e 2, e os resultados da análise estatística estão representados no Quadro 2.

O comportamento que explica o progresso de doença no caso de *Phytophthora infestans* é o de um modelo exponencial, mas, provavelmente, com o tempo, este assumirá características de um modelo logístico, devido à redução da área foliar sadia disponível (Bergamin Filho & Amorin, 1996; Campbell & Madden, 1990).

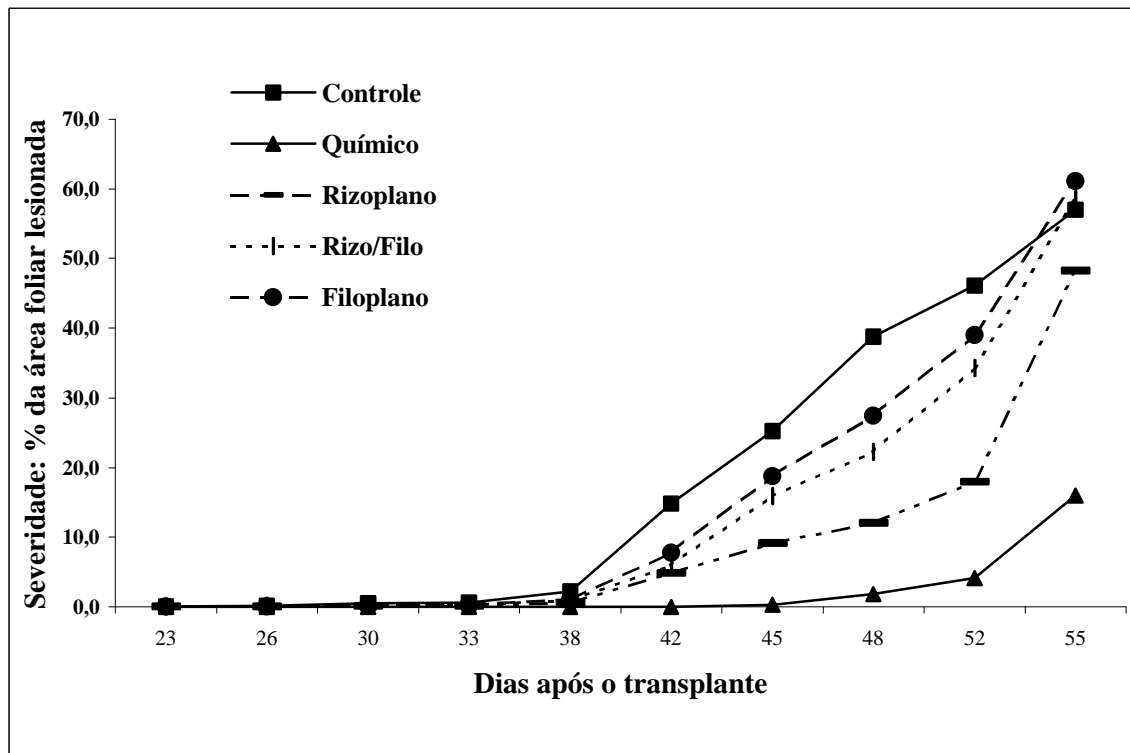


Figura 1 - Curvas de progresso de mela (*Phytophthora infestans*).

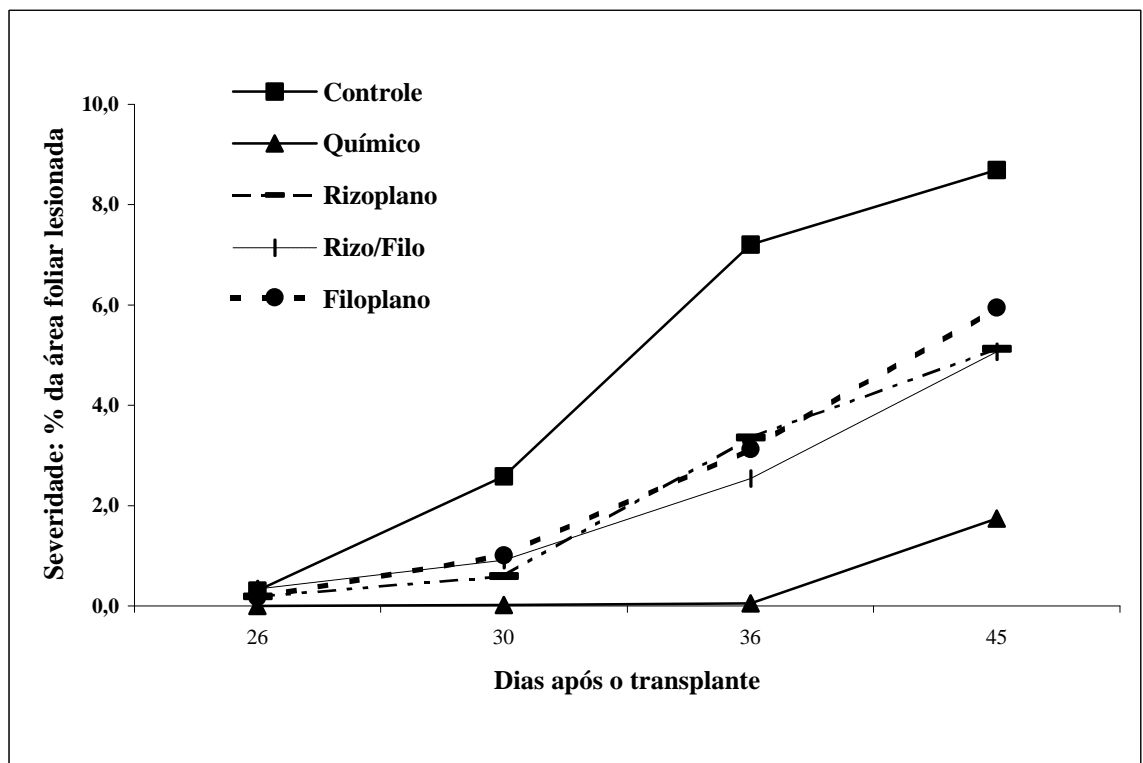


Figura 2 - Curvas de progresso da pinta preta (*Alternaria solani*)

Quadro 2 - Média da área abaixo da curva do progresso de doença (AACPD) para mela (*Phytophthora infestans*) e pinta preta (*Alternaria solani*).

Tratamentos	AACPD ¹ (% x dia)	
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Alternaria solani</i>
Controle	525,78 a	106,66 a
Filoplano	415,69 ab	55,63 b
Rizo/Filoplano	359,41 ab	47,07 b
Rizoplano	225,93 ab	51,64 b
Químico	46,00 b	8,50 c

1. AACPD seguida pela mesma letra não difere significativamente entre si, pelo teste de Fisher LSD, para $\alpha = 0,05$ de probabilidade.

Com relação à curva de progresso da mela (*Phytophthora infestans*), apesar da aparente distinção da taxa de progresso de doença, não houve, do ponto de vista estatístico, diferença significativa entre os tratamentos biológicos e o controle, e entre estes e o tratamento químico, mas foi encontrada diferença entre a variável AACPD dos tratamentos controle e do químico, segundo evidenciado pelas análises estatísticas.

O tratamento químico continua sendo a mais eficiente forma de controle de mela por *Phytophthora infestans* em tomate. Apesar do uso exclusivo de pulverizações com chlorothalonil, neste trabalho mostra-se claramente a importância dos produtos químicos usados na produção de tomates livres de uma epidemia severa de mela.

A respeito das avaliações realizadas durante o período do progresso da doença da pinta-preta, incitada por *Alternaria solani*, foi encontrada diferença significativa da variável AACPD entre os tratamentos biológicos (Rizoplano, Rizo/Filoplano e Filoplano) e o controle, havendo diferença também entre o tratamento químico e os três tratamentos biológicos. Apesar do controle químico ter sido mais efetivo, o tratamento da colonização do filoplano com o actinomiceto SON-17, o tratamento de microbiolização de sementes com o actinomiceto RD-01 e a utilização, ao mesmo tempo, dos dois tipos de tratamento biológico mostram suas potencialidades, diferindo estatisticamente do controle, como medida passível de utilização em procedimentos de manejo integrado.

Baseado nos dados observados, o actinomiceto SON-17, usado como residente do filoplano, pode estar atuando diretamente sobre os patógenos, através da ação de antibiose, bem como agindo por competição por espaço, nutrientes e nicho (Köhl & Fokkema, 1998) ou parasitismo (Micheref et al., 1993), sendo mais eficiente na redução da incidência de pinta-preta (*Alternaria solani*) do que de mela (*Phytophthora infestans*).

No caso do antagonista RD-01, usado para microbiolização de sementes, pode-se supor que, entre os possíveis mecanismos de ação exercido pelo actinomiceto na redução da percentagem da área foliar lesionada, estão provavelmente intitulados, na indução de resistência mediada pelo antagonista (Schönbeck & Dehne, 1986; Van Loon et al., 1998), bem como a ação de substâncias antimicrobianas produzidas pelo mesmo, agindo diretamente no ponto de infecção do patógeno pela absorção e translocamento pela raiz (Romeiro, 1999), ou ainda se comportando endofiticamente (Hallmann et al., 1997; Lamb et al., 1996; Sardi et al., 1992).

Devido à redução aparente da taxa de progresso das doenças nos dois patógenos investigadas, o desempenho dos antagonistas pode ser melhorado através de uma possível ação conjunta entre os tratamentos biológico e químico, havendo, com isto, a possibilidade de se tornar plausível a redução do número de aplicações de produtos químicos através do uso compatível com a implantação de agentes biológicos no campo, não afetando a produtividade, diminuindo o custo de produção e o impacto ambiental.

Considerando a capacidade dos actinomicetos em promoverem o crescimento de plantas de tomateiro em campo, não foram observadas diferenças estatísticas no que se refere à época de florescimento, à altura de plantas, ao número de folhas, ao número total de fruto por planta e produtividade.

Especula-se que, devido ao início da epidemia de mela do tomateiro no princípio do florescimento das plantas, esta doença foi capaz de afetar consideravelmente o desenvolvimento e a produtividade, subjugando qualquer ponderação a respeito de prováveis habilidades concedidas pela interação rizobactéria-planta na promoção de crescimento.

Contudo, pelos dados analisados neste trabalho, são necessárias investigações mais detalhadas a respeito dos actinomicetos RD-01 e SON-17 como prováveis agentes de biocontrole de doenças do tomateiro em campo e suas limitações no que tange à eficiência destes em diferentes tipos de solo, topografia e condições climáticas.

4. BIBLIOGRAFIA

- Benizri, E., Baudoin, E. & Guckert, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p. 557-574, 2001
- Bergamin Filho, A. & Amorin, L. *Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico* (Amorin, L., Ed.), Editora Agronômica Ceres, São Paulo, SP. 1996, 299 p
- Bettiol, W. Biological control of plant pathogens in Brazil: application and current research. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.12, p. 505-510, 1996
- Boff, P., Ribeiro do Vale, F. X., Zambolim, L. & Fontes, P. C. R. Epidemiologia comparativa da mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta-preta (*Alternaria solani*), em dois sistemas de condução do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p. 104-109, 1991a
- Boff, P., Zambolim, L. & Ribeiro do Vale, F. X. Escalas de severidade para avaliação da mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p. 280-283, 1991b
- Brown, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p. 181-97, 1974
- Campbell, C. L. & Madden, L. V. (1990). Temporal analysis of epidemics I: Description and comparison of disease progress curves. In *Introduction to Plant Disease Epidemiology* (Madden, L. V., ed.), pp. 161-202. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Garcia, F. A. O., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Deuner, C. C. & Batista, U. G. Seleção de Actinomicetos como Promotores de Crescimento e como Indutores de Resistência Sistêmica em Tomateiro à Mancha Bacteriana Pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. (Abstract), 2001^a
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Silva, H. S. A., Moura, A. B., Araújo, J. C. A., Vieira, B. A. H., Andrade, C. G. & Ferreira, E. A. Actinomicetos com Características de PGPR e Biocontrole da Pinta- Preta do Tomateiro (*Alternaria solani*) por Indução de Resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p. (Abstract), 1999

- Chang, I. & Kommedahl, T. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. **Phytopathology**, v.58, p. 1395-1401, 1968
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. & Kloepper, J. W. (1996). The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In *Management of Soil Borne Diseases* (Gupta, V. K., ed.), pp. 164-184. Kalyani, New Delhi.
- Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. & Smith, D. L. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. **Plant and Soil**, v.200, p. 205-213, 1998
- Donner, S. C., Jones, D. A., McClure, N. C., Rosewarne, G. M., Tate, M. E., Kerr, A., Fajardo, N. N. & Clare, B. G. Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.42, p. 185-194, 1993
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. & Kloepper, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 895-914, 1997
- Handelsman, J. & Stabb, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **American Society of Plant Physiologists**, v.8, p. 1855-1869, 1996
- Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. **Phytopathology**, v.69, p. 480-482, 1979
- Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. **Phytopathology**, v.70, p. 712-715, 1980
- Jones, D. A., Ryder, M. H., Clare, B. G., Farrand, S. K. & Kerr, A. Construction of a Tra-deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. **Molecular Gen. Genet.**, v.212, p. 207-214, 1988
- Kenney, D. S., Reddy, M. S. & Kloepper, J. W. Commercial potential of biological preparations for vegetable transplants. **Phytopathology**, v.89, p. S39 (Abstract), 1999
- Kerr, A. Biological control of crown gall: seed inoculation. **Journal of Applied Bacteriology**, v.35, p. 493-497, 1972

- Kloepper, J. W., Schroth, M. N. & Miller, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, v.70, p. 1078-82, 1980
- Kloepper, J. W., Zablotowicz, R. M., Tipping, E. M. & Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In *The rhizosphere and plant growth* (Cregan, P. B., ed.), pp. 315-326. Kluwer Academic Publishers.
- Köhl, J. & Fokkema, N. J. (1998). Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In *Plant-Microbe Interactions and Biological control* (Kuykendall, L. D., ed.), pp. 49 - 88., New York Basel Hong Kong, Marcel Dekker.
- Kucey, R. M. N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal Soil Science**, v.68, p. 261-270, 1987
- Kucey, R. M. N. & Leggett, M. E. Increased yields and phosphorus uptake by westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated with a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilaji*. **Canadian Journal Soil Science**, v.69, p. 425-432, 1989
- Lamb, T. G., Tonkyn, D. W. & Kluepfel, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p. 1112-1120, 1996
- Luz, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 33-77, 1993
- Luz, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p. 1-49, 1996
- Luz, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 16-20, 2001
- Mahaffee, W. F. & Kloepper, J. W. (1994). Applications of plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems* (Grace, P. R., ed.), pp. 23-31. CSIRO, Melbourne.
- Mariano, R. L. R. & Kloepper, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p. 121-137, 2000

- Micheref, S. J., Mariano, R. L. R., Padovan, I. & Menezes, M. Observações ultraestruturais entre *Colletotrichum graminicola* e agentes biocontroladores no filoplano de sorgo. **Summa Phytopathologica**, v.19, p. 99 - 101, 1993
- Moura, A. B., Romeiro, R. S. & Neves, D. M. S. Actinomicetos com atividade semelhante a PGPR em plantas de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p. 337. (abstract), 1996
- Murphy, J. F. & Zehnder, G. W. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. **Plant Disease**, v.84, p. 779-784, 2000
- Nutter, F. W. J. & Litwiller, D. (1998). A computerized disease assessment training program for foliar disease 1.0 edit. Iowa State University Research Foundation, Inc., Ames, Iowa.
- Pramer, D. & Schmidt, E. L. *Experimental soil microbiology*, Burgess Publishing Company, Saint Paul. 1964, p
- Romeiro, R. S. *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*, 56, UFV, Viçosa. 1999, 45 p
- Romeiro, R. S., Moura, A. B., Matsuoka, K. & Fernandes, M. C. Actinomicetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia solanacearum*) and growth promotion after seed microbialization. **89^a Annual Meeting of The American Phytopathological Society. Rochester, New York, USA**, v. August, p. 9-13, 1997
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Orgonovi, G. E. & Merli, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strain from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 2691-2693, 1992
- Schönbeck, F. & Dehne, H. W. (1986). Use of microbial metabolites inducing resistance against plant pathogens. In *Microbiology of the Phyllosphere* (Van den Heuvel, J., ed.), pp. 363. Cambridge University Press, Cambridge.
- Shoda, M. Bacterial control of plant disease. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, p. 515-521, 2000
- Silva, H. S. A. & Romeiro, R. S. Isolamento e seleção massal de actinomicetos antagônicos a *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Ceres**, v.48(227), p. 285-291, 2001

- 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. 453-83, 1998
- Velazhahan, R., Samiyappan, R. & Vidhyasekaran, P. Relationships between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzyme. **Journal of Plant Disease**,v.106, p. 244-250, 1999
- Wei, L., Koeppler, J. W. & Tuzun, S. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**,v.86, p. 221-224, 1996
- Zdor, R. E. & Anderson, A. J. Influence of root colonizing bacteria on the defence responses in bean. **Plant Soil**,v.140, p. 99-107, 1992
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J. & Kloepper, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**,v.107, p. 39-50, 2001

RESUMO E CONCLUSÕES

Foram testados 117 actinomicetos, sendo 96 provenientes de diferentes métodos de isolamento e 21 culturas pré-selecionadas por Moura (1996) em seu trabalho com *Ralstonia solanacearum*. Esses actinomicetos foram testados *in vitro* contra isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Alternaria solani*. Observou-se que dois isolamentos possuíam um amplo espectro de atividade, inibindo os três patógenos desafiantes, e a maioria, cerca de 88 %, não exibiu qualquer atividade antibiótica, pelo método analisado. Foi também testada a habilidade dos candidatos a antagonistas em colonizar o sistema radicular de tomateiro em condições gnotobióticas, deparando-se com uma elevada percentagem (70 %) de cepas possuidoras desta aptidão.

Essas características preditam o primeiro passo para uma efetiva interação entre a planta hospedeira e os microrganismos do solo, não sendo, portanto, uma fase decisiva da seleção, pois resultados não satisfatórios, comprovados em laboratório, sustentam hipóteses de manifestações de diferentes mecanismos de ações antagonísticas.

Ao utilizar dois patossistemas durante a triagem massal, em casa de vegetação, foram selecionados os 7 mais efetivos, e, quando da comprovação da repetibilidade e efetividade, foi selecionado um actinomiceto, RD-01, que demonstrou tendência como biocontrolador, reduzindo o número de lesões por planta, sobressaindo-se aos demais. Esse antagonista mostrou sua amplitude ao reduzir, em nível de significância, o número de lesões incitadas por diferentes patógenos foliares, mas não foi efetivo em reduzir sintomas incitados por *Ralstonia solanacearum*.

Segundo dados observados a respeito da promoção de crescimento, pode-se concluir que a ação antagonística de um agente de biocontrole não está relacionada, conclusivamente, com a ascensão direta do crescimento vegetal.

Dois actinomicetos pré-selecionados, um para microbiolização de sementes (RD-01) e outro como colonizador do filoplano (SON-17), utilizados em campo, mostraram ser de grande incentivo em pesquisas envolvendo práticas de manejo integrado.

Embora os resultados deste trabalho sejam um amplo estímulo à exploração de actinomicetos como agentes de biocontrole de enfermidades do tomateiro, há, antes de tudo, a necessidade de aprofundar conhecimentos relacionados ao estabelecimento, à sobrevivência, a dosagens do controlador e à compatibilidade com produtos químicos, que possam a ser utilizados em conjunto dentro de um manejo ecologicamente mais correto, sem ocasionar ônus ao produtor.