

HÉLVIO GLEDSON MACIEL FERRAZ

DISPENSA E DINÂMICA POPULACIONAL DO AGENTE DE BIOCONTROLE  
*Pseudomonas putida* NO FILOPLANO DE TOMATEIRO

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de “Magister Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2008

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

T

F381d  
2008

Ferraz, Hélivio Gledson Maciel, 1980-

Dispensa e dinâmica populacional do agente de biocontrole  
*Pseudomonas putida* no filoplano de tomateiro /  
Hélivio Gledson Maciel Ferraz. – Viçosa, MG, 2008.  
xi, 38f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-38.

1. Tomate - Doenças - Controle biológico. 2. Dinâmica  
Populacional. 3. *Lycopersicon sculentum*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.642996

HÉLVIO GLEDSON MACIEL FERRAZ

DINÂMICA POPULACIONAL E DISPENSA DO AGENTE DE BIOCONTROLE  
*Pseudomonas putida* NO FILOPLANO DE TOMATEIRO

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de “Magister Scientiae”

APROVADA: 31 de julho de 2008.

---

Prof. Fabio Lopes Olivares

---

Prof. Wagner Bettiol

---

Prof. José Rogério de Oliveira  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Cristina Baracat Pereira

---

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro  
(Orientador)

**Aos meus pais**

**Isabel Maciel Ferraz**

**Hélio Gonçalves Azevedo (*In memoriam*)**

**Aos meus irmãos Érica, Aline e Bruno**

**À minha avó Erozina**

**Aos meus tios Erly e Eliana Azevedo**

**Com todo o carinho,**

**Dedico este humilde trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, saúde, paz....

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

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

À minha mãe e à minha avó, pelo constante e incondicional apoio e incentivo.

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

A todos os meus familiares, em especial à minha irmã Érica, pelos constantes empréstimos sem juros!

Ao meu orientador, Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, pelos ensinamentos, paciência, por estar sempre presente e solícito a qualquer dúvida, por seu exemplo de ser humano, e principalmente pela amizade. Sou muito grato pela oportunidade de aprender com um grande mestre!

Aos meus co-orientadores, por estarem sempre dispostos a esclarecer qualquer dúvida sempre que solicitados.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas da UFV, Flávio Garcia, Roberto Lanna, José Roberto, Dirceu Macagnan, Mônica, Adriana, Márcio Tadeu, Toninho, Victor, Thaís e Lorena, pela companhia e pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa.

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

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

À minha namorada Adriana, pelo carinho, companheirismo, amor e paciência durante todo o decorrer do curso.

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

## **BIOGRAFIA**

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

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

Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia também na Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração em Bacteriologia de Plantas, sob a orientação do Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romeiro.

## ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	x
<b>Introdução</b> .....	1
<b>Revisão de literatura</b> .....	3
Bactérias residentes de filoplano e sua implicação como agentes de controle biológico em plantas .....	3
Formas de dispensa de bactérias agentes de biocontrole em plantas.....	8
Monitoramento da dinâmica populacional de bactérias em associação com plantas .....	9
<b>Materiais e Métodos</b> .....	10
Origem, cultivo e preservação dos microrganismos .....	10
Formas de dispensa do agente de biocontrole em condições de casa de vegetação .....	11
Experimento 1: Patógeno desafiante <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	11
Experimento 2: Patógeno desafiante <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	12
Idealização de um meio semi-seletivo com base na resistência múltipla constitutiva de <i>P. putida</i> (UFV-0073) a antibióticos para o estudo da dinâmica populacional da bactéria no filoplano de tomateiro .....	12
a) Antibiogramas qualitativos.....	12
b) Antibiogramas quantitativos .....	13
c) Teste de Repressividade .....	14
d) Teste de Supressividade .....	14
Dinâmica populacional de <i>Pseudomonas putida</i> .....	15
a) Em condições casa de vegetação.....	15
b) Em condições de campo.....	15

Comparação entre a dinâmica populacional de <i>P. putida</i> e o controle da pinta bacteriana do tomateiro.....	16
<b>Resultados e Discussão</b> .....	17
Formas de dispensa do agente de biocontrole no filoplano do tomateiro.....	17
Idealização de um meio semi-seletivo com base na resistência múltipla constitutiva de <i>P. putida</i> (UFV-0073) a antibióticos para o estudo da dinâmica populacional da bactéria no filoplano do tomateiro.....	20
Dinâmica populacional de <i>Pseudomonas putida</i> em filoplano de tomateiro.....	23
Comparação entre a dinâmica populacional de <i>P. putida</i> (UFV-0073) e o biocontrole da pinta bacteriana do tomateiro.....	25
<b>Conclusões</b> .....	26
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	27

## RESUMO

FERRAZ, Helvio Gledson Maciel, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Dispensa e dinâmica populacional do agente de biocontrole *Pseudomonas putida* no filoplano de tomateiro.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-orientadores: José Rogério de Oliveira e Olinto Liparini Pereira.

Na maioria dos experimentos sobre controle biológico de fitopatógenos já descritos, Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (PGPR's) são dispensadas por microbiolizaao de sementes e bactérias residentes do filoplano são dispensadas por pulverizaao da parte aérea da cultura. Procurou-se verificar, se outras formas de dispensa do agente de biocontrole são igualmente eficientes aos métodos clássicos de dispensa. Objetivou-se testar várias formas de dispensa do agente de biocontrole *Pseudomonas putida* no filoplano do tomateiro, estudar sua dinâmica populacional no filoplano e correlacionar a dinâmica populacional com o biocontrole de doenças da parte aérea da cultura. O isolado *Pseudomonas putida* (UFV-0073), autotone do filoplano de tomateiro, foi selecionado para o controle biológico de doenças da parte aérea da cultura. Foram testadas quatro formas de dispensa do agente de biocontrole em plantas de tomate: 1- sementes microbiolizadas  $DO_{540nm} = 0,3$  e logo em seguida semeadas; 2- atomizaao do filoplano do tomateiro com a cultura bacteriana  $DO_{540nm} = 0,3$ ; 3- a aplicaao dos tratamentos 1 e 2 conjuntamente e 4- atomizaao do filoplano com o sobrenadante  $DO_{540nm} = 1,0$ . Para o patossistema tomateiro e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, a melhor forma de dispensa foi a pulverizaao do filoplano com propágulos do agente de biocontrole. No patossistema *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e plantas de tomate, as melhores formas de dispensa do agente de controle biológico foram a pulverizaao do filoplano com o sobrenadante da cultura e a microbiolizaao de sementes associada à pulverizaao do filoplano com propágulos do isolado. Para o estudo da dinâmica populacional do agente de biocontrole UFV-0073, no filoplano foi desenvolvido e testado um meio semi-seletivo tirando partido da

resistência múltipla constitutiva a antibióticos. Em condições de casa-de-vegetação, houve uma tendência de queda na população do antagonista. No dia 0 (zero), a população do antagonista foi de  $8,92 \times 10^7$  UFC/g de tecido foliar e no quinto dia após a dispensa sua população foi de  $4,13 \times 10^5$ , ou seja, 215 vezes menor do que a população inicial. Em condições de campo, a queda populacional do agente de biocontrole foi mais branda, revelando uma tendência ao equilíbrio, com alternância entre aumento e queda da quantidade de bactérias recuperadas. No dia zero, a população foi de  $4,62 \times 10^6$  UFC/g de tecido foliar, nove dias após a dispensa a população passou a  $9,91 \times 10^5$  UFC/g, cerca de 5 vezes menor do que a população inicial. Por fim, foi correlacionada a dinâmica populacional com o biocontrole de *P. syringae* pv. *tomato*, quando os resultados indicaram que o biocontrole foi efetivo até o quinto dia após a dispensa do agente de controle biológico no filoplano do tomateiro. Estudos dessa natureza são necessários para se estabelecer qual a melhor forma de dispensa e qual o intervalo entre as aplicações com o agente de biocontrole, quando realizadas pulverizações visando ao controle biológico de doenças. São necessários mais estudos com o agente de biocontrole, testando o controle contra outros patógenos e em condições de casa-de-vegetação e no campo.

## ABSTRACT

FERRAZ, Helvio Gledson Maciel, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.  
**Deliver and populational tendencies of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* in the tomato phylloplane.** Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-advisers: José Rogerio de Oliveira and Olinto Liparini Pereira.

In most experiments dealing with biological control of plant diseases, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are delivered by seed microbiolization while bacterial phylloplane residents are delivered by spraying. In this work aimed to test several procedures for delivering the biocontrol agent *Pseudomonas putida* to tomato plants, as well as to study populational tendencies of the biocontrol agent in plant surfaces and to make attempts to establish correlations among populational tendencies and efficiency of biological control. The bacterium *Pseudomonas putida* (isolate UFV-0073), autochthonous in tomato phylloplane, was previously selected for the biocontrol of tomato aerial part diseases. Four deliver modes were tested, as follow: 1- seed microbiolization ( $OD_{540} = 0,3$ ) followed by planting; 2 - spraying tomato phylloplane with bacterial live propagules ( $OD_{540} = 0,3$ ); 3 – microbiolization and spraying seedlings with the antagonist (treatments 1 and 2) and 4 - spraying tomato phylloplane with the supernate obtained from bacterial culture ( $OD_{540} = 1.0$ ). Results indicated that for the pathosystem tomato - *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* the most efficient deliver mode was to spray tomato phylloplane with propagule suspension of the antagonist while for its counterpart tomato- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* pathosystem, the best deliver modes were to spray the phylloplane with culture supernates and seed microbiolization along with phylloplane spray with a propagule suspension. In order to study populational tendencies for the biocontrol agent UFV-0073 in tomato phylloplane, a semi-selective culture medium was developed and tested based on the constitutive multiple resistance to antibiotics exhibited by the aforementioned isolate of *P. putida*. Under greenhouse conditions, measurement of population tendencies as a function of time indicated a population decrease in the sense

that at day 0, the population was estimated as  $8,92 \times 10^7$  CFU/g of leaf tissue and in day 5 this population went down to  $4,13 \times 10^5$  CFU/g of leaf tissue, what means a population 215 times smaller that the original one. On the other hand, under field conditions, the populational tendency did decrease but in a slower rate and presented a tendency to equilibrium, with up and down population peaks in terms of recovered bacteria. So, at 0 day , the population was estimated as being  $4,62 \times 10^6$  CFU/g leaf fresh weight and nine days after deliver it was  $9,91 \times 10^5$  UFC/g, what means five times smaller than the population at 0 day. Last but not least, it was established a correlation between populational tendencies of the *P. putida* in the phylloplane and biocontrol of tomato bacterial speck (*P. syringae* pv. *tomato*), when results indicated that the biocontrol was effective up to the fifth day after deliver. This work provides a better understanding about the best deliver mode of *P. putida* while biocontrol agent for tomato diseases in the aerial parts as well as about time intervals for delivering the biocontrol agent under investigation.

## Introdução

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma olerícola pertencente à família *Solanaceae*, cultivada em âmbito mundial (Filgueira, 2000). Segundo dados da FAO (2006) o Brasil ocupava a nona posição entre as nações que mais cultivam a hortaliça, com uma produção estimada em 3,3 milhões de toneladas, numa área de 56,847 mil hectares.

Na região Sudeste estão as maiores produtividades e as maiores áreas plantadas de tomate de mesa e para a indústria do país, seguindo-se a região centro-oeste (Camargo Filho & Mazzei, 1997; Silva & Giordano, 2000). Os principais estados produtores de tomate são: Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná (IBGE, 2006). O estado de Minas Gerais exibe uma produção de 552,677 mil toneladas, em uma área de 8,13 mil hectares (IBGE, 2006).

Segundo Lopes & Stripari (1998), são grandes os benefícios socioeconômicos proporcionados pela cadeia agroindustrial do tomateiro no Brasil. Entretanto, vários são os fatores que diminuem a produtividade da cultura, destacando-se dentre eles as doenças, que estão altamente relacionadas com o nível de resistência genética da cultivar e o tipo de manejo empregado (Kurozawa & Pavan, 1997).

A cultura do tomateiro é suscetível a mais de 200 doenças, tanto em pré como em pós-colheita (Agrios, 1997; Jones *et al.*, 1991; Lopes & Santos, 1994). Devido à alta vulnerabilidade da cultura a doenças, são grandes as quantidades de agrotóxicos empregados para o controle de várias dessas fitomoléstias (Kurozawa & Pavan, 1997; Lopes & Santos, 1994). Dentre os problemas oriundos do uso abusivo de agrotóxicos pode-se citar: a seleção de populações de microrganismos resistentes ao princípio ativo, redução ou mesmo eliminação da microbiota benéfica, contaminação de aquíferos e o longo tempo de persistência e permanência de alguns desses compostos no solo e, ou, em órgãos vegetais (Campanhola & Bettioli, 2003; Zambolim, 2001).

Fitopatologistas em âmbito mundial buscam formas alternativas de controle de fitopatógenos, em detrimento ao uso indiscriminado de agroquímicos, a fim de atenderem ao anseio dos consumidores, que desejam alimentos mais saudáveis e que não contenham substâncias que agridam o ambiente. Para o preenchimento dessa lacuna, uma das possibilidades é o emprego de agentes de biocontrole (Etebarian *et al.*, 2005; Handelsman *et al.*, 1990; Khmel *et al.*, 1998). Dentro deste espírito, pesquisam-se agentes procariotas de biocontrole endofíticos, procariotos residentes de filoplano e

rizobactérias (Barretti, 2001; Etebarian *et al.*, 2005; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; May *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2004b).

De acordo com Lindow & Leveau (2002), bactérias são os organismos mais abundantes no filoplano de plantas, com uma população estimada em  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> de área foliar. Apesar disso, pouco se conhece sobre esses procariotas residentes de filoplano que não incitam doenças em plantas, mas que, aparentemente, exercem o biocontrole ainda que de forma parcial, em condições naturais.

A maneira pela qual a bactéria agente de biocontrole é colocada em contato com a planta alvo, é denominada forma de dispensa (Romeiro, 2007). Residentes de filoplano são comumente dispensados na parte aérea da planta (Halfeld-Vieira *et al.*, 2004) e sementes são microbiolizadas com uma suspensão contendo propágulos do antagonista para Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (Romeiro & Moura, 1999).

Para que o controle biológico de doenças em plantas seja eficiente, é necessária a determinação da quantidade mínima de células do antagonista por área foliar. Para o estudo da população de bactérias no filoplano de plantas, devem-se usar técnicas para a quantificação da mesma. Sendo que, um meio semi-seletivo tirando partido da resistência múltipla constitutiva (RMC), pode ser idealizado para o estudo populacional de um agente de biocontrole. Romeiro *et al.* (1997) idealizaram um meio semi-seletivo baseando na resistência múltipla constitutiva de isolados de *Ralstonia solanacearum* a antibióticos.

O isolado de *Pseudomonas putida* (UFV-0073) foi parcialmente investigado quanto ao biocontrole exercido em condições laboratoriais e de campo (Halfeld-Vieira, 2002). Espécies de *Pseudomonas* destacam-se pela grande capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, tais como sideróforos (Glick & Bashan, 1997).

O presente trabalho teve como objetivos: i) estudar várias formas de dispensa do agente de biocontrole *Pseudomonas putida* (UFV-0073) no filoplano de tomateiro; ii) estudar a dinâmica populacional do isolado (UFV-0073) no filoplano de plantas de tomate, tirando partido da resistência múltipla constitutiva da bactéria a antibióticos; e iii) correlacionar a dinâmica populacional de *P. putida* (UFV-0073) com o biocontrole da pinta bacteriana do tomateiro, incitada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978.

## Revisão de literatura

### **Bactérias residentes de filoplano e sua implicação como agentes de controle biológico em plantas**

Análogo ao termo rizoplano, filoplano foi proposto inicialmente (Last, 1955), para descrever a superfície da parte aérea das plantas. No início do século XXI foi usado o termo filosfera para descrever a zona próxima das folhas (Bargabus *et al.*, 2002). Filoplano foi definido como sendo a superfície foliar em Last & Deighton (1965). Devido a variações constantes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis o ambiente do filoplano é altamente complexo (Andrews & Hirano, 1991; Wilson *et al.*, 1999). Assim, a tarefa de colonização desse ambiente é mais difícil que no caso da rizosfera. Muitas bactérias promissoras para o biocontrole de doenças em plantas, não conseguem sê-lo de forma consistente por incapacidade de manter-se em população em nível ótimo, devido às adversidades do ambiente do filoplano (Leben, 1985).

Entretanto, bactérias residentes de filoplano utilizam uma ampla gama de estratégias para sobreviverem em condições desfavoráveis no meio ao qual estão posicionadas. Sabe-se que populações bacterianas podem atingir altos níveis populacionais no filoplano de plantas, em média  $10^6$  a  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> de área foliar (Andrews & Harris, 2000; Beattie & Lindow, 1995; Hirano & Upper, 2000), o que as tornam os seres mais abundantes e diversificados no filoplano (Beattie & Lindow, 1999; Kinkle, 1997; Lindow & Leveau, 2002). Adicionalmente, isso também as credencia, de forma promissora, como potenciais agentes de controle biológico de fitopatógenos. Diversos microrganismos como fungos (Munoz *et al.*, 2008), bactérias (Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; Mizubuti *et al.*, 1995; Romeiro, 2007) e leveduras (Zhao *et al.*, 2008), têm sido utilizados experimentalmente no controle biológico de diversas fitomoléstias mas, neste trabalho, o enfoque será em organismos procariotas como agente de controle biológico.

As populações bacterianas capazes de sobreviverem e multiplicarem na superfície de plantas, tendo-a como habitat (Hirano & Upper, 1983; Leben, 1965) são denominadas residentes de filoplano (Romeiro, 2007), ou como filobactérias (Beattie & Lindow, 1999) ou bactérias epífitas (Beattie & Lindow, 1999; Hirano & Upper, 1983; Leben, 1965; Lindow & Brandl, 2003; Lindow & Leveau, 2002).

As bactérias residentes de filopano possuem dois mecanismos básicos para minimizarem os efeitos deletérios do ambiente ao qual estão posicionadas, o escape e a tolerância ou resistência. O primeiro é quando a bactéria busca se estabelecer em determinados locais na planta menos sujeitos as adversidades ambientais. A tolerância ou resistência requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como: a incidência de radiação ultravioleta e baixa umidade, em função da estrutura morfológica das células (Beattie & Lindow, 1995; 1999). Portanto, a escolha de antagonistas com maior capacidade de sobrevivência é crucial para que sejam atingidos os níveis de biocontrole desejáveis (Halfeld-Vieira *et al.*, 2004). Uma das formas de escape utilizada por bactérias é a migração para o interior das folhas, permanecendo em locais protegidos, como câmaras subestomáticas, evitando as tensões externas (Mercier & Lindow, 2000; Wilson *et al.*, 1999) e, por essa razão, quando se deseja quantificar um determinado agente de biocontrole, após a dispensa do mesmo no filoplano, a recuperação da bactéria poderá ser subestimada.

As estruturas vegetais podem interferir negativamente na limitação da difusão de nutrientes e inibição do molhamento foliar, pela camada cerosa que reveste a epiderme de plantas, denominada cutícula, que pode interferir na colonização bacteriana (Lindow & Brandl, 2003). Segundo Madigan & Martinko (2006), estruturas de resistências produzidas por certas bactérias tais como endósporos são tidos como as estruturas biológicas de maior resistência a fatores químicos e físicos. Dessa maneira, bactérias produtoras de endósporos aumentariam suas chances de sobrevivência na superfície de plantas se comparadas às bactérias não endosporogênicas.

No filoplano existem microhabitats específicos (Leben, 1981; 1988; Weller & Saettler, 1980). Jacobsen (1997), em condições de baixa umidade, observou que após 1 hora da dispensa de bactérias antagônicas a *Bipolaris maydis* no filoplano de milho, não foi observado controle significativo da doença. Possivelmente ocorreu devido à incapacidade de colonização satisfatória, pois em condições ideais de umidade a população bacteriana manteve 96% a 99% das células viáveis, reduzindo em 86 a 100% o número de lesões foliares.

Ercolani (1991), trabalhando com bactérias epífitas em filoplano de oliveira, verificou um aumento da população bacteriana nas estações amenas e chuvosas, e um declínio nas estações quentes e secas. Ainda em seu trabalho, foi constatada uma maior população de procariontes em folhas mais novas do que nas folhas mais velhas.

Para a manutenção de altos níveis populacionais de bactérias na superfície de plantas são necessários níveis adequados de nutrientes (Mercier & Lindow, 2000). As plantas secretam externamente para o meio, predominantemente açúcares simples, como: glicose, sacarose e frutose (Mercier & Lindow, 2000; Tukey, 1970), sendo o carbono o principal limitante para o crescimento bacteriano. De acordo com Morris (1982), microrganismos residentes do filoplano dispõem de poucas fontes de nitrogênio e carbono em folhas mais novas, já em folhas mais velhas a quantidade e diversidade dessas fontes elevam-se, com isso aumentando também, a diversidade populacional de bactérias e dos demais habitantes do filoplano. Utilizar então agentes de biocontrole que utilizam uma ampla diversidade de fontes de carbono e nitrogênio é uma medida sábia para favorecer a colonização (Allen *et al.*, 1983).

Quanto maior o grau de similaridade entre o residente de filoplano e o patógeno, maior será a sobreposição nutricional e, portanto, maior também a competição entre eles, tornando difícil a coexistência de ambos no mesmo nicho (Wilson & Lindow, 1994). Um isolado não patogênico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* reduziu significativamente a quantidade de pústulas no tomateiro causadas por um isolado patogênico da mesma espécie (Cooksey, 1988).

Há relatos de que bactérias colonizadoras da rizosfera de plantas são também capazes de sobreviver no filoplano (Hirano & Upper, 2000; Lindow & Leveau, 2002). Algumas dessas bactérias, atuando inclusive no controle biológico de enfermidades tanto no solo como na parte aérea (Braun-Kiewnick *et al.*, 1999; Gyenis *et al.*, 2003; Korsten *et al.*, 1997; Kurze *et al.*, 2001; Lourenço Junior *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004b). Entre as bactérias citadas na literatura capazes de sobreviver nestes dois distintos habitats, incluem espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia*, *Streptomyces*, etc (Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; Hirano & Upper, 2000; Kinkle, 1997; Lindow & Leveau, 2002; Silva *et al.*, 2004b; Vieira Júnior, 2005).

Há indícios de que bactérias selecionadas para o controle biológico de doenças da parte aérea de plantas atuem como promotoras de crescimento das mesmas, quando sementes são microbiolizadas com propágulos do antagonista (Silva *et al.*, 2004a). Vieira Júnior (2005), trabalhando com residentes de filoplano previamente selecionados para o biocontrole de doenças da parte aérea do feijoeiro, observou que um de seus isolados destacou-se na promoção de crescimento do feijoeiro, quando sementes da cultura foram microbiolizadas com propágulos do isolado UFV-74 (*Pseudomonas*

*putida*). O isolado foi eficiente em promover o crescimento das plantas e aumentou em 20,8% a produtividade das mesmas, comparando com a testemunha.

A associação entre plantas e bactérias, não se limita apenas ao filoplano (Halfeld-Vieira *et al.*, 2006; Romeiro, 2007) e ao rizoplano (Moura & Romeiro, 2000; Romeiro & Moura, 1999; Silva *et al.*, 2004b); mas também bactérias que vivem dentro dos tecidos da plantas, denominadas endofitas (Chen *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008). Dentre estas associações, as mais conhecidas e estudadas são as bactérias capazes de colonizar o sistema radicular das plantas e sobreviver saprofiticamente nessa superfície, sendo denominadas segundo Kloepper & Schroth (1981), de rizobactérias ou PGPR's (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Nos últimos 20 anos estas bactérias foram extensivamente estudadas para o controle biológico e promoção de crescimento em plantas (Beauchamp, 1993; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Chen *et al.*, 1996). Contraditoriamente, pouco se sabia sobre as bactérias capazes de colonizar o filoplano de plantas (Hirano & Upper, 2000; Kinkle, 1997). O conhecimento estava concentrado no controle biológico promovido contra patógenos de plantas, pelos habitantes do filoplano (Andrews, 1992; Bettioli, 1997; Elad *et al.*, 1999; Windels & Lindow, 1985). Bactérias residentes do filoplano, estão sendo inteiramente estudadas inclusive pela indução de resistência em plantas contra patógenos (Halfeld-Vieira *et al.*, 2006).

Entre os mecanismos utilizados por bactérias no controle biológico, podem ser citados: hiperparasitismo, antibiose direta, competição por espaço e por nutrientes e indução de resistência (Baker *et al.*, 1985; Bettioli, 1991; Halfeld-Vieira *et al.*, 2006; Mizubuti *et al.*, 1995; Romeiro, 2007; Silva *et al.*, 2004b; Yuen *et al.*, 2001). Entre os métodos de controle exercidos por bactérias, a antibiose direta é a mais comumente estudada (Dhingra *et al.*, 2006; Guetsky *et al.*, 2002; Jock *et al.*, 2002; Sempere & Santamarina, 2007). De acordo com Cook & Baker (1989), antibiose é definida como sendo o fenômeno através do qual um microrganismo limita o crescimento de outro, por produção de compostos tóxicos de baixo peso molecular.

Vieira Júnior (2005), realizando seleção massal, em um universo de 500 isolados de procariontes residentes de filoplano de feijoeiro, verificou que um dos isolados, caracterizado como *Bacillus cereus* (UFV-75), destacou-se pela capacidade antagonística contra vários patógenos fúngicos e bacterianos. Um dos pontos negativos da seleção de agentes de biocontrole por antibiose direta, é que não sendo o mecanismo mediado por antibiose, corre-se o risco de descartar promissores antagonistas, que

podem ser indutores de resistência (Halfeld-Vieira *et al.*, 2006). Resultados obtidos num processo de seleção de antagonistas do filoplano de tomateiro demonstraram que se a seleção fosse feita somente com base na antibiose, excelentes agentes de controle biológico seriam descartados, pois não houve uma correlação clara entre antibiose e seleção de agentes de biocontrole *in vivo* (Halfeld-Vieira *et al.*, 2004).

Outro método de biocontrole direto vastamente estudado é a produção de sideróforos, que são compostos de baixo peso molecular (500-1000 Daltons) produzidos por bactérias e fungos, exercendo função de captura de íons  $Fe^{3+}$ , sendo posteriormente transportados para o interior da célula (Neilands, 1989). Desta maneira, sideróforos são produzidos por microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, e liberados em meio com baixa quantidade de  $Fe^{3+}$  atuando como quelantes específicos (Goto, 1990). Antagonistas produtores de grandes quantidades de sideróforos, indisponibilizariam o  $Fe^{3+}$  para o patógeno alvo (Glick & Bashan, 1997), podendo então, ser efetivo o biocontrole com base na competição.

Vieira Júnior (2005) observou que os isolados do filoplano de feijoeiro *Bacillus cereus* (UFV-172) e *Pseudomonas putida* (UFV-108), eram produtores de sideróforos. Em ensaios de campo, os isolados UFV-172 e UFV-108 reduziram a severidade da mancha angular e da ferrugem do feijoeiro. Podendo a produção de sideróforos, por estas bactérias, estar envolvida no controle biológico das doenças. Sideróforos podem atuar também na indução de resistência sistêmica de plantas a patógenos (Press *et al.*, 2001). Meziane *et al.* (2005) relataram que uma estirpe *P. putida* WCS358, originalmente isolada do rizoplano de batata, promovia o controle de várias doenças em plantas. O controle foi promovido por competição por íons ferro, mediado pela produção de sideróforos, mas os autores também observaram que em *Arabidopsis thaliana* sideróforos purificados foram capazes de induzir resistência sistêmica (IRS).

Segundo Van Loon *et al.* (1998), alguns microrganismos podem atuar indiretamente sobre patógenos, ou seja, ativando mecanismos latentes de defesa em plantas. O tratamento de plantas com componentes ou produtos microbianos pode atuar, na indução desses mecanismos latentes de resistência de plantas. Mas o controle propriamente dito, não é devido à ação direta de fatores antimicrobianos, mas sim, na capacidade do indutor em sensibilizar a planta, e esta ser capaz de ativar mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos latentes em resposta ao ataque de um patógeno potencial (Kúc, 2001). Não ocorrendo qualquer alteração no genoma da planta, induzido-resistente, a indução de resistência pela utilização dos agentes denominados,

indutores ou eliciadores, consiste no aumento do nível de resistência (Stadnik, 2000). A indução de resistência é melhor conhecida e estudada no caso de rizobactérias (Romeiro *et al.*, 2005; Van Loon *et al.*, 1998).

Um dos primeiros trabalhos mostrando que residentes do filoplano poderiam atuar na indução de resistência sistêmica em plantas foi realizado por Halfeld-Vieira *et al.* (2006), em um universo de 300 isolados provenientes do filoplano de tomateiro, selecionados para o controle biológico de doenças da parte aérea da cultura. O isolado (UFV-IEA-6) foi considerado como promissor, mesmo não apresentando ação direta sobre os patógenos, indicando ser este isolado capaz de induzir resistência sistêmica, pois o mesmo foi capaz de reduzir a severidade das doenças em casa-de-vegetação e campo.

### **Formas de dispensa de bactérias agentes de biocontrole em plantas**

A maneira pela qual a bactéria agente de biocontrole é colocada em contato com a planta alvo, é denominada forma de dispensa (Romeiro, 2007). As rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) são dispensadas, usualmente, de duas formas: microbiolização de sementes e encharcamento do sulco de plantio (Hegde & Brahma Prakash, 1992). Nesta última forma de dispensa, a suspensão contendo propágulos do agente de biocontrole é colocada diretamente no sulco de plantio (Gault *et al.*, 1982). A microbiolização de sementes é o método mais utilizado na dispensa de rizobactérias em plantas (Bashan, 1998). *Burkholderia ambifaria* (MCI 7) foi dispensada em plantas de milho por microbiolização de sementes e encharcamento de solo, a primeira forma de dispensa promoveu significativamente o crescimento do milho, ao contrário, a incorporação ao solo reduziu o crescimento da cultura (Ciccillo *et al.*, 2002). A PGPR pode atuar tanto em benefício como deletariamente a cultura alvo, dependendo da forma de dispensa utilizada.

Bactérias endófitas penetram passivamente por meio de aberturas naturais da planta, como estômatos, hidatódios, lenticelas, radículas, raízes laterais e ferimentos (Jacobs *et al.*, 1985; Lamb *et al.*, 1996). Hallmann *et al.* (1997) consideram os ferimentos ocorridos naturalmente durante o crescimento da planta a principal via de acesso. Visando otimizar a introdução de procariotas endófitos em plantas, foi proposto uma forma de dispensa que consiste na excisão das raízes, disponibilizando para a bactéria endófito ferimentos resultante da remoção do sistema radicular (Kijima *et al.*, 1995), além das aberturas naturais já existentes.

Para bactérias residentes de filoplano, a forma de dispensa mais comumente utilizada é a pulverização da parte aérea da planta com uma suspensão contendo propágulos bacterianos, tanto para promoção de crescimento (Vieira Júnior, 2005), como para promover o biocontrole de doenças em plantas (Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; Korsten *et al.*, 1997; Perello *et al.*, 2001).

### **Monitoramento da dinâmica populacional de bactérias em associação com plantas**

Monitoramento da população de bactérias no filoplano requer métodos específicos de detecção e quantificação. Existem os métodos moleculares, como as sondas moleculares e técnicas de hibridização que são satisfatórias para a detecção, mas limitadas quando o interesse é a quantificação (Hirsch, 1996; Holben *et al.*, 1998). Microrganismos modificados geneticamente e marcadores de resistência a antibióticos constituem uma alternativa simples para detecção e quantificação (Bloemberg *et al.*, 1997; Bull *et al.*, 1991). Existem também os métodos clássicos para o monitoramento de bactérias residentes do filoplano, por seleção de mutantes resistentes a antibióticos (Theodoro & Maringoni, 2002) e o desenvolvimento de meio semi-seletivo (Dhingra & Sinclair, 1985; Fahy & Persley, 1983).

Suspensão do isolado de *Pseudomonas corrugata* ( $10^9$  UFC/mL), expressando bioluminescência (mutante 4.3.t lux 18), foi inoculado em sementes de tomate. As sementes foram colocadas para germinar em leito de areia e, após a germinação, a autoradiografia indicou a presença e a posição do isolado bioluminescente sobre ramos e raízes nas mudas de tomate, causando lesões escurecidas nessas áreas e a população do patógeno foi estimada em  $10^5$  UFC por grama de tecido (Cirvilleri *et al.*, 2000).

Com o desenvolvimento de um meio semi-seletivo foi possível estudar a sobrevivência do mutante patogênico MAN 2763-D, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* resistente ao sulfato de estreptomicina, em manipueira (Theodoro & Maringoni, 2002). Outra possibilidade de utilização de um meio semi-seletivo com o uso de antibióticos, para o estudo da sobrevivência é tirando partido da resistência múltipla constitutiva (RMC) de bactérias a antibióticos (Moura & Romeiro, 1998).

Resistência múltipla constitutiva a antibióticos é quando vários isolados de uma determinada espécie bacteriana são resistentes a diversos antibióticos diferentes e ao mesmo tempo (Romeiro, 2005). Os primeiros relatos de bactérias possuindo RMC a antibióticos foram na medicina humana. Em hospitais de Tóquio em 1955 e de Londres em 1962, vários isolados da bactéria *Shigella dysenteriae*, causadora de desintei- ras em

humanos, revelaram-se naturalmente resistentes a vários antibióticos (Watanabe, 1963). Na bacteriologia de plantas foram testadas várias espécies de fitobactérias contra diversos antibióticos, as espécies testadas foram de maneira consistente resistentes aos mesmos compostos, evidenciando a presença de RMC das bactérias testadas a antibióticos (Romeiro *et al.*, 1998b). Moura & Romeiro (1998) observaram que os mais de 50 isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de várias regiões do Brasil e do exterior foram resistentes, de maneira consistente aos mesmos antibióticos. Assim, um meio semi-seletivo foi idealizado com a incorporação destes compostos ao meio de cultura. O meio foi totalmente supressivo a fungos e bactérias, possuindo baixa repressividade a *R. solanacearum*, os autores concluíram que o meio semi-seletivo idealizado, tirando partido da RMC a antibióticos, pode ser utilizado para a detecção e quantificação da bactéria em tecido vegetal e solos, entre outros.

## **Materiais e Métodos**

### **Origem, cultivo e preservação dos microrganismos**

Os microrganismos fitopatogênicos foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas (LBCBP) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. As fitobactérias: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 foram cultivadas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e preservadas por três métodos: 1- em água destilada esterelizada (Klement, 1990; Romeiro, 2007); 2- emulsificação em glicerina a 15% (Gerhardt, 1994) com posterior armazenamento em ultra-freezer a -80°C; 3- em óleo mineral, recobrimo o crescimento bacteriano (Tuite, 1969).

O agente de biocontrole UFV-0073 (*Pseudomonas putida*) é um procariota autóctone do filoplano de tomateiro e foi previamente selecionado para o biocontrole de doenças da parte aérea da cultura (Halfeld Vieira, 2002). Foi cultivado e preservado conforme as técnicas descritas para os microrganismos fitopatogênicos.

## Formas de dispensa do agente de biocontrole em condições de casa de vegetação

### Experimento 1: Patógeno desafiante *P. syringae* pv. *tomato*

O experimento foi conduzido em condições de umidade e temperatura parcialmente controladas 26<sup>0</sup>C (=/- 2<sup>0</sup>C). Sementes de tomate da cv. Santa Clara foram semeadas em copos plásticos com volume de 300 cm<sup>3</sup> com solo esterilizado. Quatro dias após a dispensa do agente de biocontrole, as plantas foram atomizadas com o patógeno desafiante. O experimento foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), para verificar qual forma de dispensa de *P. putida* no filoplano de tomateiro proporcionava melhor controle da pinta bacteriana do tomateiro, os dados foram processados pelo software SAEG 9.0 (FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES, 2005).

Para o preparo da suspensão do antagonista *P. putida* (UFV-0073), colônias foram semeadas por espalhamento, em meio 523 sólido (Kado & Heskett, 1970) e incubadas por 24 h a 28<sup>0</sup>C. Suspensão de células do agente de biocontrole foi preparada em água de torneira e ajustada a turbidez em espectrofotômetro. As formas de dispensa do antagonista foram: 1- sementes microbiolizadas DO<sub>540nm</sub>= 0,3 e logo em seguida semeadas; 2- atomização do filoplano do tomateiro DO<sub>540nm</sub>= 0,3; 3- a aplicação dos tratamentos 1 e 2 conjuntamente; 4- atomização do filoplano com o sobrenadante OD<sub>540nm</sub>= 1,0. Para a obtenção do sobrenadante, *P. putida* foi cultivada por 24 h em meio 523 sólido à 28<sup>0</sup>C, após a incubação foi feita suspensão de células do agente de biocontrole em água de torneira e a turbidez foi ajustada para DO<sub>540nm</sub>= 1,0. Posteriormente, a suspensão de células bacteriana foi centrifugada a 17500g por 20 minutos, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro Millipore (poro= 0,45µm). Sendo o filtrado dispensado nas plantas de tomate. Como controle positivo, plantas foram atomizadas com água, e plantas atomizadas com fungicida oxiclureto de cobre (1,6g i.a./ L) compôs o controle negativo.

Em plantas de tomate cv. Santa Clara com 40 dias após a semeadura foi dispensado o agente de biocontrole. Quatro dias após a dispensa do agente de biocontrole nas plantas de tomate, o patógeno desafiante, *P. syringae* pv. *tomato*, foi inoculado por atomização. O patógeno foi cultivado por 24h à 28<sup>0</sup>C, em meio sólido (Kado & Heskett, 1970) e teve a sua turbidez ajustada DO<sub>540nm</sub>= 0,15 em água de torneira. Antes e após a inoculação com o patógeno desafiante, as plantas foram

acondicionadas em câmara úmida por 24 h. Quando do aparecimento dos sintomas (7 dias) após a inoculação, as lesões por folíolo foram contadas.

### **Experimento 2: Patógeno desafiante *X. campestris* pv. *vesicatoria***

O experimento foi esquematizado a semelhança do anterior, tanto no que tange a forma de dispensa como inoculação. A severidade da doença foi estimada utilizando o software SEVERITY PRO 1.0 (Nutter Jr. & Litwiller, 1998). O software foi utilizado para aprimorar a acurácia e a precisão do avaliador.

### **Idealização de um meio semi-seletivo com base na resistência múltipla constitutiva de *P. putida* (UFV-0073) a antibióticos para o estudo da dinâmica populacional da bactéria no filoplano de tomateiro**

#### **a) Antibiogramas qualitativos**

Com o objetivo de verificar a quais antibióticos *P. putida* (UFV-0073) mostrar-se-ia insensível, foram realizados os antibiogramas qualitativos (Romeiro, 2005), utilizando discos de papel impregnados com antibióticos (Bionalyse®).

O antagonista foi cultivado em Erlenmeyer de capacidade para 50 mL, com 30 mL de meio líquido 523 (Kado & Heskett, 1970) por 24 h a 28<sup>o</sup>C, sob agitação constante a 120 rpm. Após 24 h, foi pipetada uma alíquota de 10 µL de suspensão bacteriana, para cada 10 mL do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) semi-sólido (0,8% de Agar) fundente (Romeiro, 2007). Em placas de Petri com 9 cm de diâmetro foram depositados cerca de 5 ml do meio de cultura contendo a suspensão bacteriana. Após a solidificação foram alocados equidistantemente quatro discos impregnados com antibióticos por placa de Petri.

As placas foram mantidas em B.O.D. a 28<sup>o</sup>C por 24 h, onde foi avaliada a sensibilidade ou insensibilidade da bactéria aos antibióticos testados, devido ao surgimento perceptível de halo de inibição ou não. A presença de halo de inibição indicou que o agente de biocontrole foi sensível ao antibiótico, impedindo ou reduzindo o seu crescimento normal. A ausência do halo de inibição indicou que a bactéria foi insensível ao antibiótico, crescendo normalmente ou muito próximo de seu crescimento normal.

Os antibióticos testados foram: 1- ceftriaxona, 2- cefepima, 3- cefoperazona, 4- lincomicina, 5- imipenem, 6- cefalexina, 7- neomicina, 8- ceftazidima, 9- eritromicina,

10- ácido nalidíxico, 11- doxiciclina, 12- ampicilina, 13- colistina, 14- aztreonama, 15- rifampicina, 16-piperacilina, 17-pefloxacina, 18-estreptomicina, 19- polimixina b, 20- nitrofurantoína, 21- netilmicina, 22- clindamicina, 23- tetraciclina, 24- cefuroxima, 25- trimetoprima + sulfametoxazole, 26- cefaclor, 27- meropenem, 28- fosfomicina, 29- norfloxacin, 30- cefadroxil, 31- azitromicina, 32- teicoplanina, 33- amoxicilina, 34- oxaciclina, 35- amicacina, 36- cloranfenicol, 37- tobramicina, 38- vancomicina, 39- canamicina, 40- levofloxacin, 41- gentamicina, 42- carbecilina, 43- penicilina, 44- ticarcilina + ácido clavulânico, 45- sulbactam + ampicilina, 46- amoxicilina + ácido clavulânico, 47- ácido pipemídico, 48- cefotaxima, 49- cefazolina, 50- cefoxitina, 51- novobiocina, 52- ciprofloxacina.

#### **b) Antibiogramas quantitativos**

Foram escolhidos três antibióticos: novobiocina, ampicilina e lincomicina aos quais *P. putida* mostrou-se insensível nos antibiogramas qualitativos. Os antibióticos escolhidos foram testados nas seguintes concentrações: 2500; 1250; 625; 312.5; 156.25; 78.125 e 39.0625 µg/mL.

Primeiro foi aplicada uma camada de ágar- água (2%) em placas de Petri 9cm de diâmetro, após o resfriamento dessa primeira camada, foi vertida uma segunda camada contendo o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) semi- sólido contendo propágulos do agente de biocontrole. UFV-0073 foi cultivado por 24 h a 28<sup>0</sup>C e, vertida dentro do Erlenmeyer contendo o meio 523, na proporção de 10 µL de suspensão bacteriana para cada 10 mL de meio.

Em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro), foram realizados seis furos de diâmetro de 1 cm, com o auxílio de um furador e depois o recorte foi sugado por uma bomba de vácuo com uma ponteira de pipeta (P 100) na extremidade da mangueira, para proporcionar uma cavidade uniforme. Em cada cavidade foi depositada com uma pipeta (P 100) uma alíquota de 50 µL de cada uma das concentrações dos antibióticos. Após a adição dos antibióticos as placas foram levadas a geladeira por 12 h, para uma melhor difusão dos antibióticos no meio de cultura. Posteriormente, as placas foram mantidas por 24 h a 28<sup>0</sup>C, onde se observou a presença ou ausência de halo de inibição em volta das cavidades. Cada tratamento foi representado por uma concentração dos antibióticos com três repetições e como controle foi utilizado água esterilizada na cavidade.

### **c) Teste de Repressividade**

Para a realização do ensaio de repressividade com *P. putida*, procedeu-se a representação cartesiana dos dados da curva de crescimento do antagonista com os três antibióticos: Lincomicina, Novobiocina e Ampicilina, adicionados juntos ao meio de cultura, para verificar se o crescimento do isolado bacteriano seria reprimido. A cada duas horas eram aferidas a turbidez dos frascos (“side arm flask”), contendo os tratamentos descritos abaixo, em espectrofotômetro.

*Pseudomonas putida* foi cultivada em meio líquido (Kado & Heskett, 1970) por 24h sob agitação a 120 rpm. Em quatro “side-arm flasks” com capacidade de 250 mL, foram colocados 100 mL de meio líquido, esterilizado em autoclave. Em dois “side-arm flasks” foram pipetadas alíquotas dos antibióticos, de modo que a concentração final atingisse 30 µg/L em um “side arm” e 60 µg/L no outro, e também foi adicionado cicloheximida, resultando em uma concentração final 150 µg/L em ambos os “side-arm flasks”.

Depois a três dos quatro “side-arm flasks” foram pipetados 100 µL da cultura do antagonista cultivado em meio 523 líquido por 24 h a 28°C. O “side-arm flask” contendo o meio de cultura e a bactéria, foi o controle; o só contendo o meio servia para zerar o espectrofotômetro.

### **d) Teste de Supressividade**

Em um Erlenmeyer de capacidade de 250 mL, contendo 200 mL de solução salina (0,85%) e Tween 80 (0,05%) esterilizados; foram adicionados 20 g de folhas de tomateiro coletados em plantação de tomate orgânico, e posteriormente, submetidos a banho de ultra-som por 25 minutos para melhor recuperação dos microrganismos do filoplano.

Alíquotas de 1 mL do lavado foram transferidas para tubo de ensaio contendo solução salina (0,85%) + Tween 80 (0,05%). Diluições (fator 1/10) foram obtidas até  $10^{-10}$ , e, de cada fator de diluição foram retiradas alíquotas de 100 µL da suspensão, seguida-se por semeio em placas de Petri contendo meio 523.

De cada fator de diluição foram retiradas quatro alíquotas de 100 µL, sendo duas alíquotas semeadas em duas placas de Petri contendo 5 mL de meio 523, e as outras duas alíquotas semeadas em duas placas de Petri com 5 mL de meio 523 contendo os três antibióticos a 60 µg/L + cicloheximida a 150 µg/L. Em seguida as placas foram

mantidas por 48h a 28<sup>0</sup>C. As colônias foram contadas e UFC/g de tecido foliar estimados.

### **Dinâmica populacional de *Pseudomonas putida* em filoplano de tomateiro**

#### **a) Em condições de casa de vegetação**

Sementes de tomate cv. Santa Clara foram semeadas em copos plásticos contendo 300 cm<sup>3</sup> de solo esterilizado, e mantidas em casa de vegetação. Quando as plantas estavam com o quarto par de folhas definitivas, foram pulverizadas com suspensão de propágulos de *Pseudomonas putida* (DO<sub>540nm</sub>= 0,4) multiplicado em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) sólido por 24 h a 28<sup>0</sup>C. Após: 0 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 120 horas, 216 horas, 456 horas; foi coletada uma folha do terço médio da planta de tomate, em cada um desses intervalos de tempo. A folha foi pesada e transferida para um Erlenmeyer contendo 200 mL de solução salina (0,85%) esterilizado e Tween 80 (0,05%), e submetida à radiação de ultra-som por 25 minutos para a extração do antagonista da folha.

Após a obtenção do lavado, foi feita a diluição seriada em tubos de ensaio contendo salina (0,85%) esterilizado e Tween 80 (0,05%). Em placas de Perti contendo meio seletivo para *P. putida* (meio semi-sólido + antibióticos), foi transferido 100µL das diluições (10<sup>-1</sup> até 10<sup>-8</sup>) do lavado. Em seguida a suspensão foi espalhada com alça de Drigalsky, e as placas transferidas para a incubadora a 28<sup>0</sup>C por 24 h quando foi contado o número de colônias por placa. Como controle, plantas de tomate sem a dispensa do agente de biocontrole, foram utilizadas.

#### **b) Em condições de campo**

Sementes de tomate cv. Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>, e mantidas em casa de vegetação. Trinta e cinco dias após a semeadura as plantas foram transferidas para o campo. O experimento foi realizado no período de 19 de janeiro a 14 de fevereiro de 2008 no sítio Criciúma, próximo ao campus da Universidade Federal de Viçosa-MG. O espaçamento foi de 0,8 m entre fileiras e 0,5 m entre plantas. As adubações foram realizadas conforme a “Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais 5<sup>a</sup> aproximação” (Ribeiro *et al.*, 1995). As plantas foram conduzidas em haste única e

tutoradas com estacas de bambu, realizando-se periodicamente tratamentos culturais como desbrotas e amarração das plantas.

Uma semana após o transplante as plantas foram pulverizadas com suspensão de propágulos de *Pseudomonas putida* ( $DO_{540nm} = 0,4$ ) multiplicado em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) sólido por 24 h a 28°C. Após: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 216 e 456 horas; foram coletadas três folíolos ao acaso das plantas pulverizadas com o agente de biocontrole em cada um dos intervalos de tempo. As plantas foram divididas em três partes: terço inferior, terço médio e terço superior; sendo coletado um folíolo em cada um dos terços. Os folíolos foram pesados e transferidos para um Erlenmeyer contendo 200 mL de solução salina (0,85%) esterilizada e Tween 80 (0,05%), e submetida à radiação de ultra-som por 25 minutos para a extração do antagonista da folha.

Após a obtenção do lavado, foi feita a diluição seriada em tubos de ensaio contendo salina (0,85%) esterilizada e Tween 80 (0,05%). Em placas de Petri contendo meio seletivo para *P. putida* (meio semi-sólido + antibióticos), foi transferido 100µL das diluições ( $10^{-1}$  até  $10^{-8}$ ) do lavado. Em seguida a suspensão foi espalhada com alça de Drigalsky, e as placas transferidas para a incubadora a 28°C por 24 h quando foi contado o número de colônias por placa. Como controle, plantas de tomate sem a dispensa do agente de biocontrole, foram utilizadas.

### **Comparação entre a dinâmica populacional de *P. putida* e o controle da pinta bacteriana do tomateiro**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. Em vasos plásticos contendo 2 dm<sup>3</sup> de solo esterilizado, foram transplantadas mudas de tomate da cv. Santa Clara produzidas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>. Plantas de tomate com o quarto par de folhas definitivas foram pulverizadas em diferentes intervalos de tempo com suspensão de células do agente de biocontrole, cultivado em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e com turbidez ajustada com água de torneira para  $DO_{540nm} = 0,4$ .

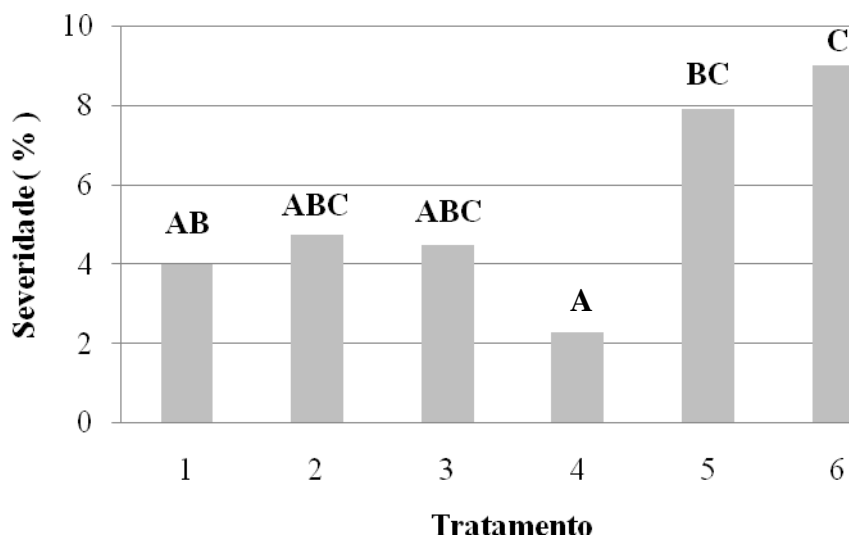
Os intervalos de tempo das dispensas do isolado UFV-0073 e a inoculação com o patógeno desafiante foram: 19; 10; 5; 3; 1,5 e 0 dia. Para cada intervalo de tempo foram pulverizados seis vasos, contendo 2 plantas por vaso. Dezenove dias após a primeira dispensa, ou seja, intervalo de tempo 0 dia, todas as plantas, dos tratamentos (cada intervalo de tempo constituindo um tratamento) e o controle (plantas pulverizadas

com água), foram inoculadas com o patógeno desafiante *P. syringae* pv. *tomato*, cultivado por 24 h em meio sólido 523 e, tendo a turbidez ajustada ( $DO_{540nm} = 0,15$ ). Um dia antes e um dia após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara-de-nevoeiro a 26°C. Posteriormente, as plantas retornaram para casa-de-vegetação e após o surgimento dos sintomas característicos da pinta bacteriana do tomateiro, contou-se o número de lesões por folíolo em todos os folíolos das plantas. O experimento foi estabelecido em DIC e análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software SAEG 9.0 (FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES, 2005).

## Resultados e Discussão

### Formas de dispensa do agente de biocontrole no filoplano do tomateiro

Para o patossistema tomateiro e *X. campestris* pv. *vesicatoria*, a melhor forma de dispensa do isolado UFV-0073 de *P. putida* foi a pulverização do filoplano com propágulos do mesmo (Figura 1), diferindo do controle (plantas pulverizadas) com água e até mesmo do tratamento com fungicida cúprico (oxicloreto de cobre) na dose recomendada para a cultura. Embora seja conhecido que fungicidas cúpricos exerçam certo controle contra bacterioses (Gitattis *et al.*, 1986; Yunis *et al.*, 1980), não há ainda no mercado um produto altamente eficiente para o controle de bactérias fitopatogênicas (Romeiro, 2005).



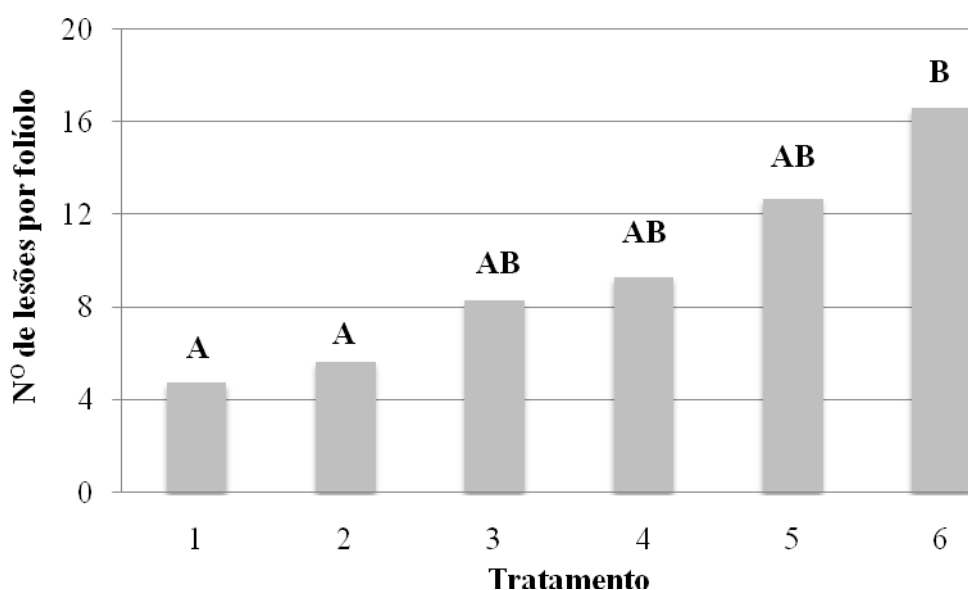
**Figura 1:** Efeito de formas de dispensa do isolado UFV-0073 de *Pseudomonas putida* no filoplano de tomateiro na severidade de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Tratamentos: 1-

Sobrenadante de cultura do antagonista; 2- Semente microbiolizadas + pulverização do filoplano; 3- Microbiolização de sementes; 4- Pulverização do filoplano; 5- Plantas pulverizadas com oxiclreto de cobre (1,6 g i.a./L) e 6- Plantas pulverizadas com água. Utilizando como patógeno desafiante *X. campestris* pv. *tomato*, OD<sub>540</sub> = 0,15 e DMS (0,05). CV= 43,8

Como esperado, a pulverização do filoplano foi a melhor forma de dispensa do agente de controle biológico, uma vez que o mesmo foi isolado inicialmente do filoplano de tomateiro. O segundo melhor tratamento, foi a pulverização da parte aérea com o sobrenadante da bactéria, diferindo do controle, mas sendo igualmente eficiente as plantas tratadas com o fungicida cúprico (oxiclreto de cobre). No sobrenadante podem estar contidas substâncias antimicrobianas, que podem atuar contra o patógeno desafiante, pois há inúmeros relatos de espécies de *Pseudomonas* produtoras de tais substâncias (Kloepper *et al.*, 1980; Montesinos *et al.*, 1996). Como  $\beta$ -1,3 glucanases (Fridlender *et al.*, 1993), ácido cianídrico (Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Muleta *et al.*, 2007), antibióticos (Raaijmakers *et al.*, 1997), sideróforos (Meziane *et al.*, 2005). Como nesse tratamento a densidade ótica da suspensão bacteriana foi superior aos demais tratamentos, DO<sub>540nm</sub> = 1, pode ter ocorrido uma maior concentração dessas substâncias antimicrobianas, comparando-se com as demais formas de dispensa do agente de biocontrole, com isso potencializando o controle biológico. As demais formas de dispensa de *P. putida* não se mostraram tão eficientes como os tratamentos 4 e 1. Não diferindo estatisticamente do controle (plantas pulverizadas com água), nem das plantas tratadas com o fungicida.

No patossistema *P. syringae* pv. *tomato* e plantas de tomate, as melhores formas de dispensa do agente de controle biológico foram a pulverização do filoplano com o sobrenadante da cultura e a microbiolização de sementes + a pulverização do filoplano com propágulos do isolado (Figura 2). Neste patossistema, um dos melhores tratamentos foi a dispensa de sobrenadante da cultura do agente de biocontrole (tratamento 1). Assim pelas mesmas razões supracitadas podem ter atuado na diminuição do número de lesões incitadas pelo patógeno desafiante. O tratamento 2 (Figura 2) foi igualmente eficiente ao tratamento 1.

A microbiolização de sementes é uma das formas mais utilizadas de aplicação de agentes de biocontrole em plantas (Luz, 1994; Romeiro *et al.*, 1998a; Romeiro *et al.*, 1997). No tratamento 2 (Figura 2) a microbiolização de sementes pode ter incrementado o biocontrole da mancha-bacteriana-pequena, uma vez que o tratamento 2 foi estatisticamente diferente do tratamento controle (plantas pulverizadas com água), e os tratamentos 3 e 4, microbiolização de sementes e pulverização do filoplano, respectivamente, não diferiram estatisticamente do controle. O tratamento 3 (microbiolização de sementes) embora não diferindo estatisticamente do controle (tratamento 6), reduziu em mais da metade a severidade da doença. Pode ter ocorrido indução de resistência sistêmica (ISR) uma vez que foi atendido um dos pré-requisitos para o estado de indução segundo Steiner & Schönbeck (1995), ou seja, houve separação espacial entre o agente indutor de resistência e o patógeno alvo, pois o agente de biocontrole foi aplicado no rizoplano e o patógeno desafiante foi pulverizado no filoplano de tomateiro. São necessários mais trabalhos para a elucidação dos reais mecanismos de controle biológico exercidos pela bactéria e também verificar se as formas de dispensa que apresentaram os melhores desempenhos em casa de vegetação são reproduzidas em condições de campo.



**Figura 2:** Efeito de formas de dispensa do isolado UFV-0073 de *Pseudomonas putida* no filoplano de tomateiro na severidade de *P. syringae* pv.

*tomato*. Tratamentos: 1- Sobrenadante de cultura do antagonista; 2- Sementes microbiolizadas + pulverização do filoplano; 3- Microbiolização de sementes; 4- Pulverização do filoplano; 5- Plantas pulverizadas com oxiclreto de cobre (1,6 g i.a./L) e 6- Plantas pulverizadas com água. Utilizando como patógeno desafiante *P. syringae* pv. *tomato*, DO<sub>540</sub> = 0,15 e DMS (0,01). CV=48,73

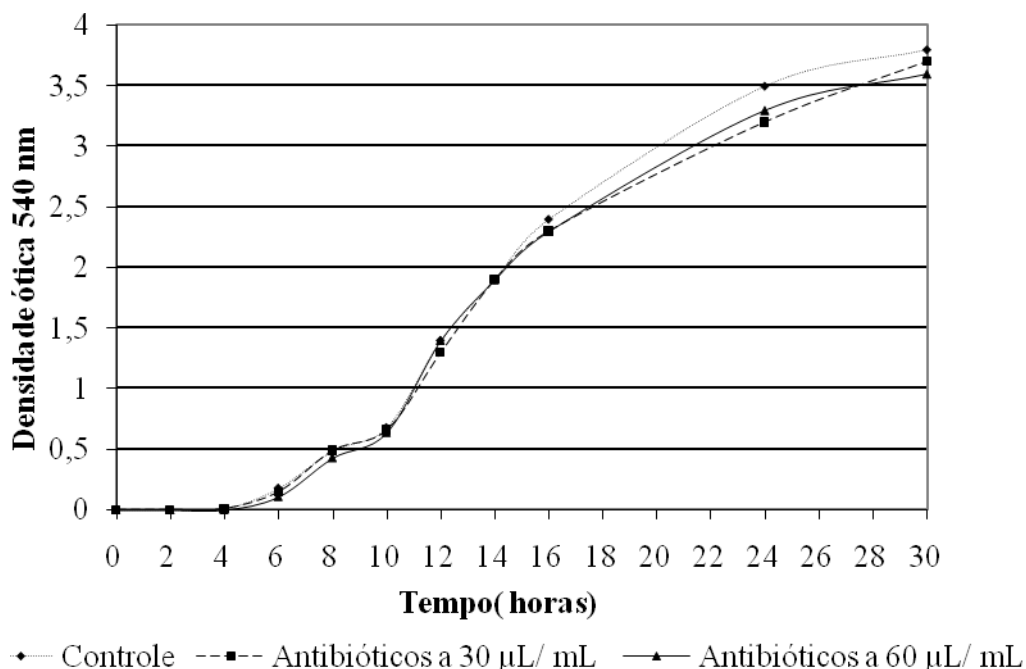
### **Idealização de meio semi-seletivo com base na resistência múltipla constitutiva de *P. putida* (UFV-0073) a antibióticos para o estudo da dinâmica populacional da bactéria no filoplano do tomateiro**

Nos antibiogramas qualitativos o antagonista *P. putida* (UFV-0073) revelou-se resistente a 9 (ampicilina, amoxicilina, cefazolina, cefepima, cefoxitina, cefuroxima, lincomicina e trimetopima + sulfametoxazol) dos 52 antibióticos testados .

Desses antibióticos ao qual o isolado revelou ser insensível, três deles foram escolhidos: ampicilina, novobiocina e lincomicina. Devido ao espectro de ação desses antibióticos, pois; ampicilina e novobiocina têm ação contra bactérias gram positivas e gram negativas e lincomicina têm espectro de ação contra bactérias gram positivas (FIOCRUZ, 2008). Esses antibióticos foram testados em diferentes concentrações por meio de antibiogramas quantitativos, e em todas as concentrações testadas, o agente de controle biológico foi insensível. *P. putida* foi resistente aos três antibióticos quando adicionados separadamente, a cavidades feitas no meio de cultura. Foi verificada uma insensibilidade considerável da bactéria aos antibióticos testados, até 2500 µg/mL, indicando que o fenômeno observado pode se tratar de resistência múltipla constitutiva a antibióticos (RMC). Quando uma população de microrganismo é resistente a vários antibióticos diferentes e, ao mesmo tempo essa população é dita possuidora de RMC a antibióticos, como evidenciados em outros trabalhos (Romeiro, 1998; Romeiro, 1997), apesar de o presente trabalho ter utilizado apenas um isolado de *P. putida*.

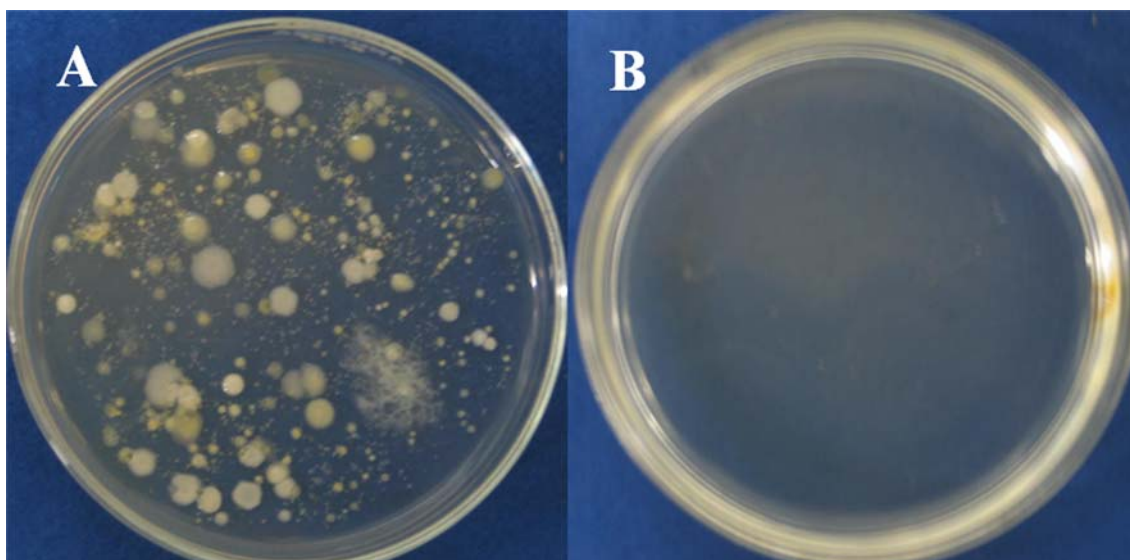
No teste de repressividade (Figura 3) foi avaliado se o isolado UFV-0073 continuaria insensível aos três antibióticos quando adicionados ao meio de cultura conjuntamente, até a concentração de 60 µg/mL. Nesse estudo verificou-se que a curva de crescimento do controle (meio de cultura sem adição de antibióticos), foi equivalente a dos outros dois tratamentos, antibióticos adicionados ao meio de cultura a 30 µg/mL e a 60 µg/mL. As curvas de crescimento apresentaram um

mesmo padrão, podendo-se depreender que o meio semi-seletivo idealizado foi pouco repressivo ou mesmo não repressivo ao antagonista (Figura 3).

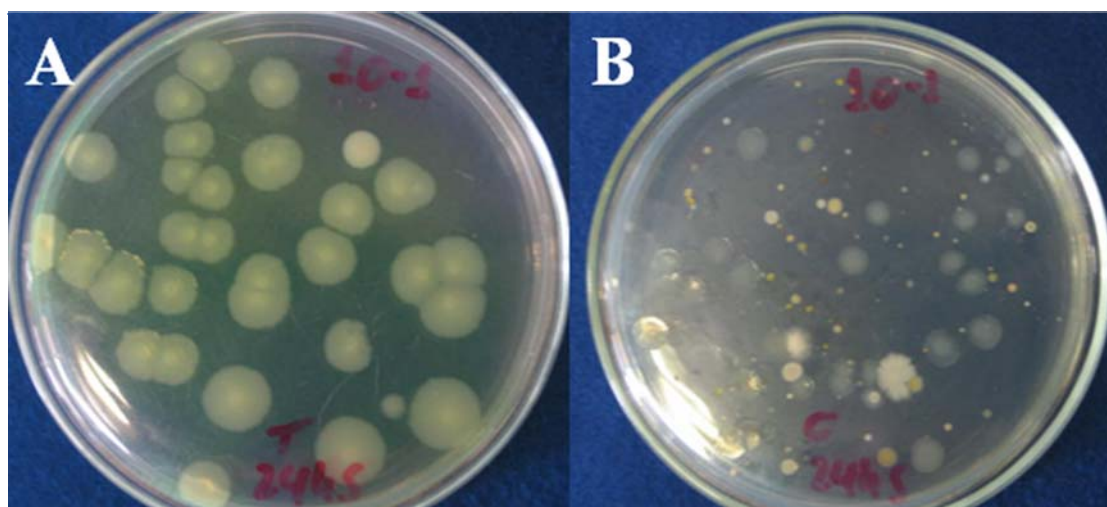


**Figura 3:** Curvas de crescimento de *Pseudomonas putida* no meio semi-seletivo, contendo ampicilina, novobiocina e lincomicina nas concentrações finais de 30 µg/mL e 60 µg/mL. No controle não foi adicionado antibióticos.

O meio semi-seletivo, com base na resistência múltipla constitutiva a antibióticos, revelou ser altamente supressivo aos demais procariotas residentes do filoplano de tomateiro, mas houve eventual crescimento fúngico. Visando sanar essa aparente deficiência do meio semi-seletivo foi adicionado ao meio semi-seletivo cicloheximida (150 µg/mL, concentração final do meio), um potente inibidor da síntese protéica em organismos eucariotas. Com a adição desse composto, o meio tornou-se altamente supressivo a toda microbiota do filoplano do tomateiro (Figura 4) e, sem ser supressivo a *P. putida* (UFV-0073) (Figura 5). O meio tornou-se, então, adequado para o estudo da dinâmica populacional da bactéria quando dispensada no filoplano.



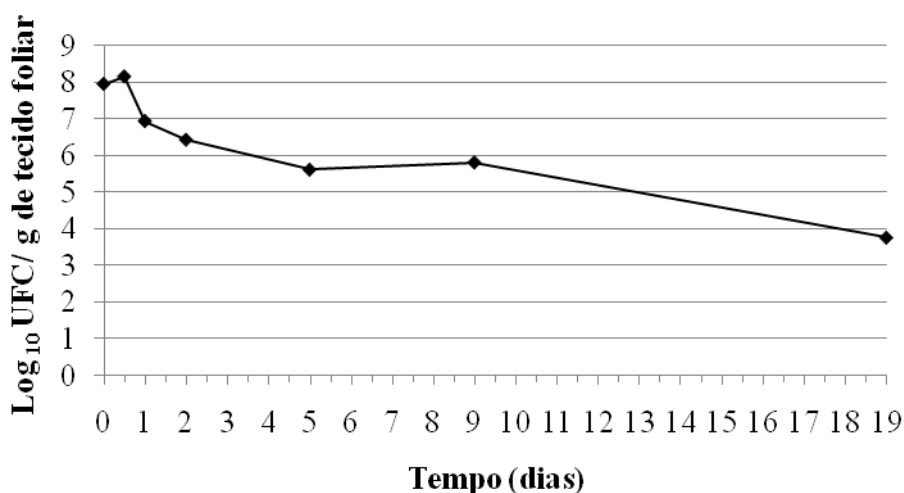
**Figura 4-** Crescimento dos microrganismos residentes do filoplano do tomateiro em meio 523. A- Meio sem adição dos antibióticos e de cicloheximida; e B- Meio semi-seletivo contendo cicloheximida e os antibióticos ampicilina, lincomicina e novobiocina.



**Figura 5-** Plantas de tomate foram pulverizadas com *Pseudomonas putida*, posteriormente obteve-se um lavado das folhas. A- Meio semi-seletivo contendo ampicilina, lincomicina, novobiocina e cicloheximida, apenas com o crescimento do agente de biocontrole; e B- Meio sem adição dos antibióticos e cicloheximida, com o crescimento de *P. putida* e dos residentes do filoplano obtidos da suspensão de lavado de folhas de tomate pulverizados com a bactéria.

### Dinâmica populacional de *Pseudomonas putida* em filoplano de tomateiro.

Com a elaboração do meio semi-seletivo baseado na resistência múltipla constitutiva da bactéria a antibióticos, foi possível o estudo da dinâmica populacional de *P. putida* quando dispensada no filoplano de tomateiro, em casa de vegetação (Figura 6).



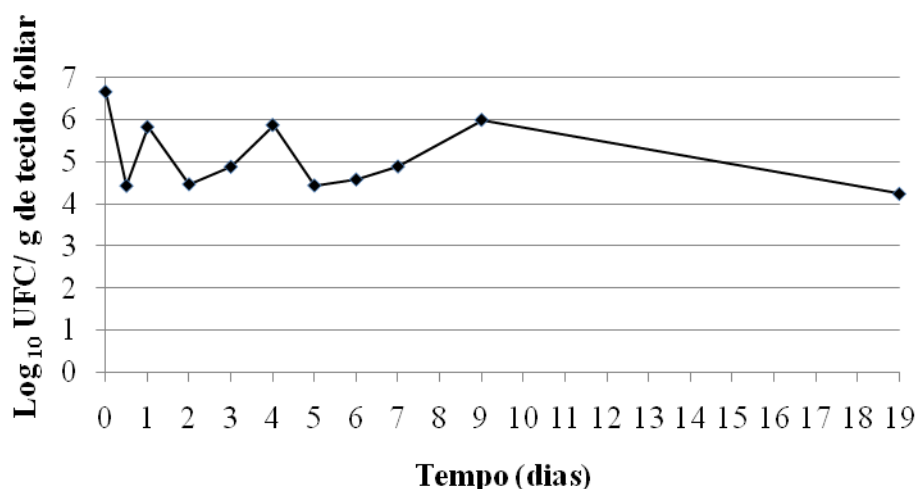
**Figura 6-** Dinâmica populacional de *Pseudomonas putida* quando dispensada no filoplano de tomateiro em condições de casa de vegetação.

Na (Figura 6) observa-se uma tendência de queda na população do antagonista. No dia 0 (zero) a população do antagonista foi de  $8,92 \times 10^7$  UFC/g de tecido foliar, no quinto dia após a dispensa da bactéria sua população foi de  $4,13 \times 10^5$ , ou seja, 215 vezes menor do que a população inicial. Já no décimo nono dia a população foi de  $5,83 \times 10^3$ , 15.300 vezes menor do que a população inicial.

Essa queda brusca na população do antagonista indica que o agente de biocontrole não foi capaz de suportar a competição com a microbiota epífita, e ou, não foi capaz de superar as adversidades que o filoplano proporciona como variações bruscas de temperatura e umidade, radiações solares e ultravioletas, etc (Andrews & Hirano, 1991; Kinkle, 1997; Lindow & Brandl, 2003). Além disso, precisa ser considerado que a baixa taxa de recuperação foi devida a técnica utilizada (sonificação), pois segundo Hirano & Upper (2000) é difícil remover bactérias epífitas pelos métodos de sonificação e lavagem de folhas, haja vista que as mesmas alojam em locais mais protegidos na planta, como o apoplasto (ex.:

espaços intercelulares) ou mesmo locais protegidos nas camadas da epiderme foliar.

No estudo da dinâmica populacional do agente de controle biológico em condições de campo (Figura 7) observou-se uma tendência ao equilíbrio do nível populacional, com alternância em aumento e queda da quantidade de bactérias recuperadas. No dia zero a população foi de  $4,62 \times 10^6$  UFC/g de tecido foliar, nove dias após a dispensa a população foi de  $9,91 \times 10^5$  UFC/g, cerca de cinco vezes menor do que a população inicial. Essa queda mais suave da população do agente de biocontrole, em condições de campo, pode ser devido às chuvas que ocorreram no período do experimento, possivelmente ocorrendo um maior espalhamento da bactéria no filoplano das plantas de tomate, ou mesmo, devido a uma qualidade superior dos nutrientes exsudatos pelas plantas de tomate no filoplano, já que em condições de campo as plantas foram adubadas conforme a recomendação de adubação para a cultura (Ribeiro *et al.*, 1999). Em condição de casa de vegetação as plantas não foram adubadas. A manutenção da população em um nível alto, mesmo nove dias após a dispensa, revela a capacidade do agente de biocontrole em colonizar e multiplicar no filoplano do tomateiro, credenciando o mesmo como um bom agente de controle biológico (Romeiro, 2007).



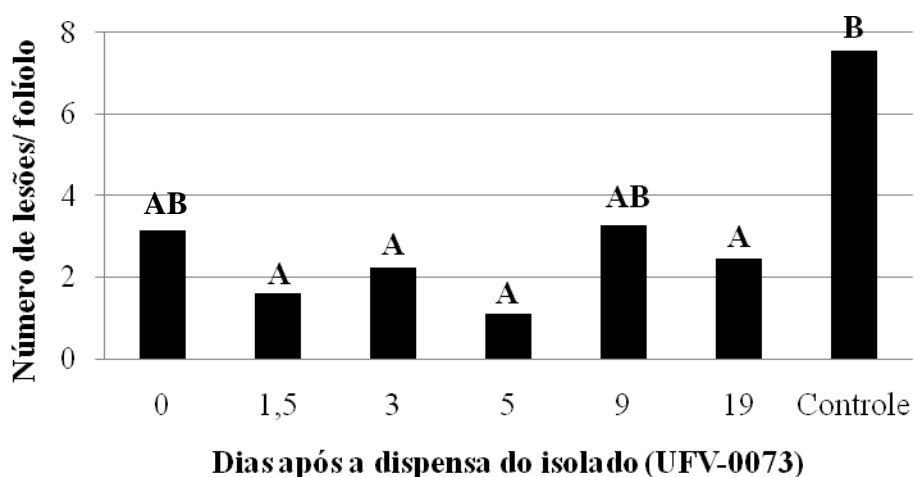
**Figura 7-** Dinâmica populacional de *Pseudomonas putida* quando dispensada no filoplano de tomateiro em condições de campo.

### **Comparação entre a dinâmica populacional de *P. putida* (UFV-0073) e o biocontrole da pinta bacteriana do tomateiro**

A comparação entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido foliar (Figura 6) e o número de lesões/folíolo causadas por *P. syringae* pv. *tomato* em condição de casa de vegetação (Figura 8), indica que o biocontrole foi efetivo até o quinto dia após a dispensa do agente de controle biológico no filoplano do tomateiro. Apesar da queda brusca na população do isolado Ufv-0073 (Figura 6), o número de lesões/folíolo proporcionado pelo antagonista mantiveram-se abaixo do controle (plantas pulverizadas com água) (Figura 8).

Na Figura 6, pode ser notado que mesmo com uma alta população do agente de biocontrole  $8,97 \times 10^7$  UFC/g de tecido foliar, no dia 0 (zero) o biocontrole exercido não diferiu estatisticamente do controle das plantas pulverizadas com água (Figura 8). Talvez o agente de biocontrole não teve tempo suficiente para colonizar satisfatoriamente o filoplano do tomateiro no dia 0 (zero), ou também, que um dos mecanismos de controle biológico exercido pelo antagonista se fundamente em indução de resistência sistêmica (ISR), uma vez que para existir ISR há necessidade de existir um intervalo de tempo entre a aplicação do agente indutor e a expressão da resistência pela planta (Steiner & Schönbeck, 1995).

A explicação para o biocontrole exercido 19 dias após a dispensa (Figura 8), ter sido tão eficaz, mesmo com uma baixa população do agente de biocontrole  $5,83 \times 10^3$  UFC/g de tecido foliar, pode ser devido à queda de folhas do tomateiro. Foi observado grande desfolha depois de decorridos 10 dias da dispensa. Presumiu-se então, que o número de lesões/folíolo foi subestimado.



**Figura 8:** Biocontrole da pinta bacteriana do tomateiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, em função do dia após a dispensa do agente de biocontrole no filoplano da cultura.

### Conclusões

- i- Os resultados indicaram que outras formas de dispensa do residente de filoplano podem ser igualmente eficientes, ou mesmo, superiores a pulverização do filoplano. Para cada patógeno desafiante, deve ser estudada qual a melhor forma de dispensa de *P. putida* (UFV-0073).
- ii- O meio semi- seletivo idealizado tirando partido da resistência múltipla constitutiva de *P. putida* (UFV- 0073) a antibióticos, revelou ser pouco repressivo e altamente supressivo, o que possibilitou o estudo da tendência populacional do agente de biocontrole no filoplano de tomateiro.
- iii- Parece haver uma tendência de queda na população do antagonista, em condições de casa-de-vegetação. Já em condições de campo, parece haver uma tendência ao equilíbrio do nível populacional. A manutenção da população em um nível alto populacional revela a capacidade do agente de biocontrole em colonizar e multiplicar no filoplano do tomateiro, credenciando o mesmo como um bom agente de controle biológico.

- iv- A comparação entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido foliar e o biocontrole contra o patógeno *P. syringae* pv. *tomato* em condição de casa de vegetação, indicou que o biocontrole foi efetivo até o quinto dia após a dispensa do agente de controle biológico no filoplano do tomateiro.
- v- Estudos dessa natureza são necessários para se estabelecer qual a melhor forma de dispensa e qual o intervalo mínimo entre as aplicações com o agente de biocontrole, quando pulverizações forem realizadas, visando o controle biológico de doenças. São necessários mais estudos com o agente de biocontrole, testando o controle contra outros patógenos, e em condições de casa-de-vegetação e de campo, e em diferentes épocas do ano.

### Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: New York: Academic Press. ed. 635p. 1997.
- ALLEN, D.A.; AUSTIN, B.; COLWELL, R.R. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a fresh water fishery. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2043-2062, 1983.
- ANDREWS, J.H. Biological-Control in the Phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 603-635, 1992.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 145-180, 2000.
- ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag. ed. 1991.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, p. 770-772, 1985.
- BARGABUS, R.L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 289-298, 2002.

- BARRETTI, P.B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencial para o biocontrole de enfermidades do tomateiro**. Tese de Mestrado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - Brasil. p. 2001.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729-770, 1998.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 145-172, 1995.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353-359, 1999.
- BEAUCHAMP, C.J. Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents. **Phytoprotection**, v. 71, p. 19-27, 1993.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. ed. 388p. 1991.
- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 59 - 97, 1997.
- BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.
- BLOEMBERG, V.G.; O'TOOLE, G.A.; LUGTENBERG, B.J.J.; KOLTER, R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4543-4551, 1997.
- BRAUN-KIEWNICK, A.; JACOBSEN, B.J.; SANDS, D.C. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the Causal Agent of Basal Kernel Blight of Barley, by Antagonistic *Pantoea agglomerans*. **Biological Control**, v. 90, p. 368-375, 1999.
- BULL, C.T.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Relationships between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. **Phytopathology**, v. 81, p. 954-959, 1991.
- CAMARGO FILHO, W.P.; MAZZEI, A.R. Mercado mundial de tomate e o mercosul. **Informações Econômicas**, v. 27, p. 25-38, 1997.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. ed. 279p. 2003.

- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ; KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological-Control of Fusarium-Wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v. 5, p. 83-91, 1995.
- CHEN, Y.; MEI, R.L., L.; KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S.; GUPTA, V.K. **Management of soil born disease**. Ludhiana: Kalyani Publishers. ed. pp. 165-184. 1996.
- CHO, K.M.; HONG, S.Y.; LEE, S.M.; KIM, Y.H.; KAHNG, G.G.; LIM, Y.P.; KIM, H.; YUN, H.D. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microbial Ecology**, v. 54, p. 341-351, 2007.
- CICCILLO, F.; FIORE, A.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 238-245, 2002.
- CIRVILLERI, G.; BELLA, P.; CATARA, V. Luciferase genes as a marker for *Pseudomonas corrugata*. **Journal of Plant Pathology**, v. 82, p. 237-241, 2000.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Praticce of Biological Control of Plant Pathogens**. Saint Paul: APS Press. ed. 539p. 1989.
- COOKSEY, D.A. Reduction of infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using a nonpathogenic, cooper-resistant strain combined with a cooper bactericide. **Phytopathology**, v. 78, p. 601-603, 1988.
- DHINGRA, O.D.; COELHO-NETTO, R.A.; RODRIGUES, F.A.; SILVA, G.J.; MAIA, C.B. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress Fusarium-yellow of beans. **Biological Control**, v. 39, p. 75-86, 2006.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press. ed. 355p. 1985.
- ELAD, Y.; BÉLANGER, R.R.; KÖHL, J. Biological control of diseases in the phyllosphere. In: ALBAJES, R.; LODOVICA GULLINO, M.; VAN LENTEREN, J.C.; ELAD, Y. **Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops**. Dordrecht/ Boston/London: CIHEAM. ed. pp. 338 - 352. 1999.
- ERCOLANI, G.L. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. **Microbial Ecology**, v. 21, p. 35-48, 1991.

- ETEBARIAN, H.R.; SHOLBERG, P.L.; EASTWELL, K.C.; SAYLER, R.J. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 591-598, 2005.
- FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**. Sidney: Academic Press. ed. 393p. 1983.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations- Agricultural Database**. <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>. Acessado em 07 de Agosto de 2007.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura-agrotecnológica moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV. ed. 402p. 2000.
- FIOCRUZ. **Fundação Oswaldo Cruz**. <http://bvsfiocruz.fiocruz.br>. Acessado em 06 de outubro de 2008.
- FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES. **Sistema para análises estatísticas: SAEG 9.0**. Viçosa: 1 CD-ROM. 2005
- FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil and Biology Biochemistry**, v. 25, p. 1211-1221, 1993.
- GAULT, R.R.; CHASE, D.L.; BROCKWELL, J. Effects of spray inoculation equipment on the viability of *Rhizobium* spp. in liquid inoculants for legumes. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 22, p. 299-309, 1982.
- GERHARDT, P.E. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. ed. 791p. 1994.
- GITATTIS, R.D.; BELL, D.K.; SMITTLT, D.A. Epidemiology and control of bacterial blight and canker of cowpea. **Plant Disease**, v. 70, p. 187-190, 1986.
- GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 353-378, 1997.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathogens**. San Diego: Academic Press. ed. 342p. 1990.
- GUETSKY, R.; ELAD, Y.; SHTIENBERG, D.; DINOOR, A. Improved biocontrol of *Botrytis cinerea* on detached strawberry leaves by adding nutritional supplements to a mixture of *Pichia guilermoidii* and *Bacillus mycoides*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, p. 625-630, 2002.

- GYENIS, L.; ANDERSON, N.A.; OSTRY, M.E. Biological Control of Septoria Leaf Spot Disease of Hybrid Poplar in the Field. **Plant Disease**, v. 87, p. 809-813, 2003.
- HALFELD-VIEIRA, B.A. **Bactéria residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** Doutorado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Minas Gerais. 108 p. 2002.
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 638-643, 2004.
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; PEREIRA, M.C.B. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.
- HALFELD VIEIRA, B.A. **Bactéria residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** Doutorado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Minas Gerais. 108 p. 2002.
- 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.; RAFFEL, S.; MESTER, E.H.; WUNDERLICH, L.; GRAU, C.R. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 713-718, 1990.
- HEGDE, S.V.; BRAHMAPRAKASH, G.P. A dry granular inoculant of *Rhizobium* for soil application. **Plant Soil**, v. 144, p. 309-311, 1992.
- HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Ecology and Epidemiology of Foliar Bacterial Plant-Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 243-269, 1983.
- HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 624-653, 2000.
- HIRSCH, P.R. Detection of microbial DNA sequences by colonisation. In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. **Molecular**

- Microbial Ecology Manual.** The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. ed. pp. 1–12. 1996.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacteria community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3491–3498, 1998.
- JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 1262-1265, 1985.
- IBGE. **Tomate - IBGE prevê redução na produção nacional** <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Infconj/textos07/Tomate/ITomate0607.htm>. Acessado em 07 de agosto de 2007.
- JACOBSEN, C.S. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. **Plant and Soil**, v. 189, p. 139-144, 1997.
- JOCK, S.; VÖLKSCH, B.; MANSVELT, L.; GEIDER, K. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. **Microbiology Letters**, v. 211, p. 247-252, 2002.
- JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. **Compendium of Tomato Diseases**. Saint Paul, MN: APS Press. ed. 73 p., 1991.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.
- KHMEL, I.A.; SOROKINA, T.A.; LEMANOVA, N.B.; LIPASOVA, V.A.; METLITSKI, O.Z.; BURDEINAYA, T.V.; CHERNIN, L.S. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, p. 45-57, 1998.
- KIJIMA, T.; YONAI, S.; OOHASHI, K.; AMAGAI, M. **Process for biologically preventing dicotyledoneous plant diseases using symbiotic bacteria**. USA Patent. No. 5.401.655(03-28-1995). 1995. p.
- KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 327-347, 1997.

- KLEMENT, Z.R., K.; SANDS, D. C. **Methods in Phyto bacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó. ed. 568p. 1990.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. Enhanced plant growth-promoting by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885-886, 1980.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Relationship of in vitro antibiosis against *Erwinia carotovora carotovora* of plant growth-promoting rhizobacteria to radish and potato plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v. 71, p. 1020-1024, 1981.
- KORSTEN, L.; DE VILLIERS, E.E.; WEHNER, F.C.; KOTZE, J.M. Field surveys of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. **Plant Disease**, v. 81, p. 455-459, 1997.
- KÚC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. **Europeam Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 7-12, 2001.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres. ed. pp. 690-719. 1997.
- KURZE, S.; BAHL, H.; DAHL, R.; BERG, G. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Plant Disease**, v. 85, p. 529-534, 2001.
- 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.
- LAST, F.T. Seazonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 48, p. 221 - 229, 1955.
- LAST, F.T.; DEIGHTON, F.C. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 48, p. 83-99, 1965.
- LEBEN, C. Epiphytic Microorganisms in Relation to Plant Disease. **Annual Review of phytopathology**, v. 3, p. 209-230, 1965.
- LEBEN, C. How plant pathogenic survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-637, 1981.
- LEBEN, C. Introductory remarks:Biological control strategies in the phylloplane. In: WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the phylloplane**. Saint Paul: APS Press. ed. pp. 1-5. 1985.

- LEBEN, C. Relative-Humidity and the Survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**, v. 78, p. 179-185, 1988.
- LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875-1883, 2003.
- LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 238-243, 2002.
- LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ. ed. 61p. 1994.
- LOPES, M.C.; STRIPARI, P.C. **A cultura do tomateiro**. São Paulo: UNESP. ed. 257-319p. 1998.
- LOURENÇO JUNIOR, W.; MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.; ROMEIRO, R.S. Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. **Biological Control**, v. 38, p. 331-340, 2006.
- LUZ, W.C.da. Effect of seed microbiolization on grain yield and on controlling common root rot and seed-borne pathogens of wheat. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 144-148, 1994.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. **Brock Biology of Microorganisms** (11). Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall. ed. 2006.
- MAY, R.; VOLKSCH, B.; KAMPMANN, G. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in vitro and in planta. **Microbial Ecology**, v. 34, p. 118-124, 1997.
- MERCADO-BLANCO, J.; RODRIGUEZ-JURADO, D.; HERVAS, A.; JIMENEZ-DIAZ, R.M. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. **Biological Control**, v. 30, p. 474-486, 2004.
- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 369-374, 2000.
- MEZIANE, H.; VAN DER, S.I.; VAN LOON, L.C.; HOFTE, M.; BAKKER, P.A.H.M. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 177-185, 2005.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J.J.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 540-544, 1995.

- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y.; BEER, S.V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**, v. 86, p. 856 - 863, 1996.
- MORRIS, C.E. Diversity of epiphytic bacterial communities on bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves and pods based on nutrient utilization. **Phytopathology**, v. 72, p. 936, 1982.
- MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Um meio seletivo para *Ralstonia solanacearum* baseado em resistência múltipla natural a antibióticos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 466-470, 1998.
- MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Actinomicetos pré-selecionados para controle de *Ralstonia solanacearum* com promotores de crescimento em tomateiro. **Revista Ceres**, v. 47, p. 613-626, 2000.
- MULETA, D.; ASSEFA, F.; GRANHALL, U. In vitro antagonism of rhizobacteria isolated from *Coffea arabica* L. against emerging fungal coffee pathogens. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, p. 577-586, 2007.
- MUNOZ, Z.; MORET, A.; GARCES, S. The use of *Verticillium dahliae* and *Diplodia scrobiculata* to induce resistance in *Pinus halepensis* against *Diplodia pinea* infection. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 331-337, 2008.
- NEILANDS, J.B. Siderophore systems of bacteria and fungi. In: BEVERIDGE, T.J.; DOYLE, R.J. **Metal ions and Bacteria**. New York: John Wiley & Sons. ed. pp. 141-163. 1989.
- PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.D. Identification and antibiotic control of endophytic bacteria contaminants in micropropagated potato explants. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, p. 827-834, 2003.
- PERELLO, A.; SIMON, M.R.; ARAMBARRI, A.M.; CORDO, C.A. Greenhouse screening of the saprophytic resident microflora for control of leaf spots of wheat (*Triticum aestivum*). **Phytoparasitica**, v. 29, p. 341-351, 2001.
- PRESS, C.M.; LOPER, J.E.; KLOEPPER, J.W. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. **Phytopathology**, v. 91, p. 593-598, 2001.
- RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 881-887, 1997.

- RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 359p. 1999.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas (2)**. Viçosa: Editora UFV. ed. 417p. 2005.
- ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV. ed. 269p. 2007.
- ROMEIRO, R.S.; LANNA FILHO, R.; VIEIRA-JÚNIOR, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; CARVALHO, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 153, p. 120-123, 2005.
- ROMEIRO, R.S.; FRITZEN, L.F.; MOURA, A.B.; SILVA, H.S.A. Promoção de crescimento e indução de resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em decorrência da microbiolização de sementes de tomateiro com actinomicetos. **Fitopatologia Brasileira**, v.23. p. 215, 1998a.
- ROMEIRO, R.S.; MOURA, A.B. Avaliação in vitro de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, p. 281-288, 1999.
- 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<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Phytopathological Society. Rochester, New York, USA**, v. August, p. 9-13, 1997.
- ROMEIRO, R.S.; MOURA, A.B.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, G.S.A.; BARBOSA, L.S.; SOARES, F.M.P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 213-218, 1998b.
- ROMEIRO, R.S.; MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R.; SILVA, G. S. A.; BARBOSA, L. S.; SOARES, F. M. P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 213-218, 1998.
- ROMEIRO, R.S.M., A. B. AND SILVA, H. S. A. Resistência múltipla constitutiva a antibióticos em *Pseudomonas solanacearum* como estratégia para idealização de um meio seletivo. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 57, 1997.

- RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. **Mycopathologia**, v. 163, p. 183-190, 2007.
- SILVA, H.S.A.; DEUNER, C.C.; ROMEIRO, R.S. Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 281-283, 2004a.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J.L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 371–375, 2004b.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, I.B. Produção mundial e nacional. **Tomate para processamento industrial**, p. 168, 2000.
- STADNIK, M.J. Induction of resistance to powdery mildew. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 175-177, 2000.
- STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology)**. Dordrech: Kluwer Academic Pub. ed. pp. 86-110. 1995.
- THEODORO, G.D.; MARINGONI, A.C. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in "manipueira" under environmental conditions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 37, p. 945-953, 2002.
- TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minneapolis: Burgess. ed. 70p. 1969.
- TUKEY, H.B. Leaching of substances from plants. **Annual Review of plant physiology**, v. 21, p. 305- 324, 1970.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- VIEIRA JÚNIOR, J.R. **Procariontes residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. DS, PhD, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 2005.

- WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. **Bacteriology Reviews**, v. 27, p. 87-115, 1963.
- WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Colonization and Distribution of *Xanthomonas-Phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var *fuscans* in Field-Grown Navy Beans. **Phytopathology**, v. 70, p. 500-506, 1980.
- WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1435-1443, 1999.
- WILSON, M.; LINDOW, S.E. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (ICE+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (ICE-) biological control agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3128-3137, 1994.
- WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological Control on the Phylloplane** (2nd). Saint Paul: The American Phytopathological Society. ed. 1985.
- YUEN, G.Y.; STEADMAN, J.R.; LINDGREN, D.T.; SCHAFF, D.; JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, v. 20, p. 395-402, 2001.
- YUNIS, H.; BASHAM, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. **Plant Disease**, v. 65, p. 937-939, 1980.
- ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado-Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: Depto. de Fitopatologia. ed. 722p. 2001.
- ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X.F.; JING, W.; YANG, J.L.; SU, Z.P. Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani*, *Rhizopus stolonifer*, and *Botrytis cinerea* on tomato fruit by *Pichia guilliermondii*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83, p. 132-136, 2008.