



**BRUNA CANABARRO POZZEBON**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO MANEJO DA MANCHA E  
DA PINTA BACTERIANA E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DO TOMATEIRO**

**LAVRAS - MG  
2018**

**BRUNA CANABARRO POZZEBON**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO MANEJO DA MANCHA E DA PINTA  
BACTERIANA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

Pozzebon, Bruna Canabarro.

Bactérias endofíticas no manejo da mancha e da pinta  
bacteriana e promoção de crescimento do tomateiro. / Bruna  
Canabarro Pozzebon. - 2018.

107 p. : il.

Orientador(a): Ricardo Magela de Souza.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. Xanthomonas vesicatoria. 2. Pseudomonas syringae pv  
tomato. 3. Enzimas de defesa. I. de Souza, Ricardo Magela. . II.  
Título.

**BRUNA CANABARRO POZZEBON**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO MANEJO DA MANCHA E DA PINTA  
BACTERIANA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO TOMATEIRO  
ENDOPHYTIC BACTERIA IN THE MANAGEMENT OF BACTERIAL SPOT AND  
PINT AND GROWTH PROMOTION OF TOMATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 30 de maio de 2018.

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Dra. Flávia Mara Vieira Lelis Ninfa

Wageningen University

Dra. Whasley Ferreira Duarte

DBI/UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2018**

*A minha mãe por ser sempre o meu alicerce.  
Ao meu pai, por ser o homem da minha vida.  
A minha irmã Priscila, pelo amor incondicional.  
A minha avó Mathilde, por todo amor e orações.  
A minha nona Virginia (in memoriam), por ser o meu anjo.  
Com todo amor e carinho,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, à minha família, especialmente meus pais, Benjamin Francisco Pozzebon e Maria de Lourdes Canabarro Pozzebon, e irmã, Priscila Canabarro Pozzebon, por me ensinarem o significado da saudade, do amor supremo e da humildade... pela, preocupação, carinho e apoio incondicional na profissão que escolhi, pelo incentivo à busca de meus sonhos e objetivos, por estarem presentes nos momentos difíceis, sempre incentivando a dar o melhor de mim em qualquer coisa que eu me proponha a fazer.

À Deus, por guiar e não permitir fraquejar nos momentos difíceis, por conceder a realização deste sonho e colocar pessoas especiais no meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do doutorado e pelo crescimento profissional.

Ao meu orientador, professor Dr. Ricardo Magela de Souza, pela orientação, ensinamentos e apoio durante a realização desse trabalho.

Aos professores Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, e Antônia dos Reis Figueira, pela orientação, valiosas sugestões, ideias, ensinamentos e por disponibilizar recursos e equipamentos em seus laboratórios, para realização desse estudo.

À minha estagiária, Ana Luiza Figueiredo Cabral, pela amizade e pela ajuda em tudo o que fiz, do início ao fim. Sem você, nada disso seria possível, e eu nunca teria conseguido sozinha.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, que dividiram a vida comigo nesses últimos anos: Ana Maria, Moysa, Melina, Ana Luíza, Rosemary, Flávia, Gabriel, Gustavo, Daniel, Sandra, David, Vitória, Aline e Fernanda. Obrigada pela amizade, momentos de risos, festas surpresas, bolos e cafés, e pela colaboração e sugestões nos trabalhos!

À Ana Cristina Andrade Monteiro, Carlos Cardon, Sérgio Bruno Fernandes, Daniele Costa Pompeu, Priscila Geraldino de Souza Duarte e Kelly Marques, pelas valiosas explicações e ensinamentos, e principalmente, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos que Lavras e a Ufla me proporcionaram: Mara Elisa, Amanda, Marina Cristian e Yasmim. Obrigada por me receberem tão bem, e serem meus grandes amigos aqui. Foi muito bom ter encontrado vocês nessa caminhada. Lavras só foi boa porque tive vocês ao meu lado.

À minha amiga, quase irmã, confidente e meu porto seguro, Mara Elisa. Obrigada por tudo que sempre fizeste por mim. Obrigada não apenas por ter dividido a casa, mas por ter dividido a vida, e por sempre torcer por mim.

Aos grandes amigos que fiz ainda no Sul, e que sempre estiveram comigo em todos os momentos, mesmo à distância, torcendo e incentivando: Priscila Paris, Marlon Bastiani, Marciele Barbieri, André Zeist, Janete Munareto, Luana Cadore e Keilor Dorneles. Agradeço pela amizade sólida que construímos há anos, que sobrevive a qualquer distância e a qualquer problema... Que possamos conservar esse carinho e amor que temos uns pelos outros, independente de qualquer coisa.

A todos os colegas de pós-graduação, com os quais eu convivi durante esses anos, em especial à Deila, Alexandre, Ariana, Felipe e Mário, pelos momentos de risada em meio ao desespero.

Ao meu namorado Lucas Cardoso Lima, pelo companheirismo, compreensão, força, incentivo e amor em todos os momentos. Obrigada pela paciência e por estar ao meu lado. Amo você, por tudo o que és e pela pessoa que sou depois de te conhecer.

À minha psicóloga, Petrisa Lacerda, pela ajuda e suporte nos momentos difíceis.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos e por contribuir significativamente com a minha formação profissional e pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente Adriana, Angélica, Ariane, Luana, Bruno e Carzinho pelo carinho e amizade.

Ao professor Luciano Vilela Paiva, pelo uso do Laboratório Central de Biologia Molecular.

Ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em especial aos Laboratórios de Bacteriologia de Plantas, Fisiologia do Parasitismo e Virologia, pelo suporte na execução dos experimentos.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho. Aos que estiveram comigo, fisicamente ou em pensamento, mandando boas energias e rezando para que tudo desse certo. Não somos nada sozinhos!

**Muito Obrigada!**

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”*

*(Martin Luther King)*



## RESUMO

As doenças de etiologia bacteriana estão entre os principais fatores que afetam a produtividade da cultura do tomateiro. A mancha e a pinta bacteriana tem se destacado nos últimos anos, causando perdas de 60% e 70%, respectivamente, quando ocorrem em condições favoráveis ao seu desenvolvimento. O controle de bacterioses, além de ser extremamente difícil, requer a adoção de medidas preventivas, como a aquisição de sementes e mudas sadias, eliminação de plantas voluntárias da área de plantio, cultivares resistentes e produtos químicos e cobre, os quais, muitas vezes são pouco eficazes no controle das doenças. Dessa forma, o controle biológico mediado por bactérias endofíticas, pode ser uma alternativa de manejo eficiente para reduzir o uso excessivo de defensivos no cultivo do tomateiro. Assim, objetivou-se com esse trabalho, avaliar o potencial de biocontrole de bactérias endofíticas, contra a pinta e a mancha bacteriana do tomateiro, visando elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos no controle das duas doenças, além de verificar o potencial de promoção de crescimento por elas promovido, em plantas de tomateiro. Foram selecionados 15 bactérias endofíticas para realização dos testes de controle biológico das doenças supramencionadas e para os testes de promoção de crescimento. O isolado Ufla - 22 foi o mais eficaz para controle da mancha bacteriana e o isolado Ufla - 285, o mais eficaz no controle da pinta bacteriana, reduzindo em 45% e 56% a severidade da doença, respectivamente. Foi possível observar também que esses isolados apresentaram efeito indutor de resistência, pois induziram o aumento da transcrição do gene *SOD* e proporcionaram incrementos na atividade de enzimas de defesa PAL, POX, SOD, APX e CAT, em plantas de tomate da cultivar suscetível Santa Clara. Além disso, dos 15 isolados testados, observou-se que alguns foram bons promotores de crescimento e melhoraram substancialmente a qualidade fisiológica de sementes de tomate. Dessa forma, pode-se sugerir que o uso de bactérias endofíticas no manejo de doenças da cultura do tomateiro pode ser promissor, pois o controle biológico integrado a outras práticas de manejo pode reduzir os custos de produção e ser efetivo no controle das doenças supramencionadas.

**Palavras-chave:** *Xanthomonas vesicatoria*. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Enzimas de defesa. SOD.

## ABSTRACT

Diseases of bacterial etiology are among the main factors affecting tomato crop productivity. The spot and bacterial speck has been prominent in recent years, causing losses of 60% and 70%, respectively, when they occur in favorable conditions for their development. The control of bacterial diseases, besides being extremely difficult, requires the adoption of preventive measures, such as the acquisition of seeds and healthy seedlings, elimination of volunteer plants from the planting area, resistant cultivars and chemical products and copper, which are often effective in controlling disease. Thus, the biological control mediated by endophytic bacteria, can be an efficient management alternative to reduce the excessive use of pesticides in tomato crop. The objective of this work was to evaluate the potential of biocontrol of endophytic bacteria against tomato and bacterial spot of the tomato, in order to elucidate some mechanisms of action involved in the control of the two diseases, as well as to verify the potential of growth promotion promoted by them, in tomato plants. Fifteen endophytic bacteria were selected for the biological control tests of the above mentioned diseases and for growth promotion tests. The Ufla - 22 isolate was the most effective for controlling the bacterial spot and the Ufla - 285 isolate, the most effective in the control of bacterial pints, reducing disease severity by 45% and 56%, respectively. It was also possible to observe that these isolates presented resistance inducing effect, since they induced the increase of SOD gene transcription and provided increases in the activity of PAL, POX, SOD, APX and CAT defense enzymes in tomato plants of the susceptible cultivar Santa Clara. In addition, of the 15 isolates tested, it was observed that some were good growth promoters and substantially improved the physiological quality of tomato seeds. Thus, it can be suggested that the use of endophytic bacteria in the management of diseases of the tomato crop can be promising, since the biological control integrated to other management practices can reduce production costs and be effective in controlling the diseases mentioned above.

**Keywords:** *Xanthomonas vesicatoria*. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Enzymes of defense. SOD.

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL .....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS .....	16
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	19
ARTIGO 1    Bactérias endofíticas no controle biológico e indução de resistência contra a mancha bacteriana do tomateiro. ....	19
RESUMO.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Origem, cultivo e preservação dos microrganismos .....	22
2.2 Teste de patogenicidade.....	24
2.3 Potencial de antagonismo <i>in vitro</i> .....	24
2.4 Proteção de plantas de tomateiro contra a mancha bacteriana .....	25
2.5 Análises moleculares e bioquímicas da resposta de defesa induzida por bactérias endofíticas em tomateiro contra a mancha bacteriana .....	27
3 RESULTADOS .....	30
4 DISCUSSÃO .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ARTIGO 2    Bactérias endofíticas no manejo da pinta bacteriana do tomateiro: Análises bioquímicas e moleculares. ....	53
RESUMO.....	54
1 INTRODUÇÃO.....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1 Origem dos microrganismos endofíticos e patogênicos .....	56
2.2 Antagonismo <i>in vitro</i> .....	56
2.3 Proteção de plantas de tomateiro contra a mancha bacteriana .....	57
2.4 Análises moleculares e bioquímicas da resposta de defesa induzida por bactérias endofíticas em tomateiro contra a pinta bacteriana.....	59
3 RESULTADOS .....	63
4 DISCUSSÃO .....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ARTIGO 3    Promoção de crescimento de plantas de tomateiro por bactérias endofíticas. ..	85
RESUMO.....	86
1 INTRODUÇÃO.....	87

2 MATERIAL E MÉTODOS .....	88
2.1 Origem dos microrganismos endofíticos .....	88
2.2 Bacterização de sementes como método de introdução dos agentes endofíticos .....	89
2.3 Teste padrão de germinação e crescimento de plântulas de tomateiro .....	90
2.4 Promoção de crescimento em casa de vegetação .....	90
2.5 Produção de ácido indol acético (AIA) .....	91
2.6 Solubilização de fosfato inorgânico .....	92
3 RESULTADOS .....	92
4 DISCUSSÃO .....	96
5 CONCLUSÕES .....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101

## PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, superada apenas pela batata. É considerada uma cultura comercialmente importante para pequenos e médios agricultores, devido aos empregos diretos e indiretos que gera (FILGUEIRA, 2000; NAIKA et al., 2006).

A China é o maior produtor mundial de tomate, seguida pela Índia, Estados Unidos, Turquia, Egito, Irã, Itália e finalmente, o Brasil, o qual ocupa a oitava posição no *ranking* mundial da produção de tomate, com produção aproximada de quatro milhões de toneladas, cultivadas numa área de 71 mil hectares (FAO, 2014). Em 2015, cerca de 4,1 milhões de toneladas de tomate foram produzidos no Brasil. Os principais estados produtores foram Goiás, Minas Gerais e São Paulo, representando aproximadamente 65% da produção nacional (IBGE, 2016).

A cultura do tomate, entretanto, está sujeita a inúmeros problemas fitossanitários, principalmente doenças foliares de etiologia bacteriana, que reduzem a produtividade, oneram os custos de produção e se destacam principalmente pela dificuldade no manejo e no controle. Por esses motivos, geralmente são utilizadas altas dosagens de agrotóxicos durante a produção da cultura (HALFELD – VIEIRA, 2004).

Entre as doenças foliares de origem bacteriana mais frequentes em cultivos de tomate, merecem destaque a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920; Vauterin; Hoste; Kersters; Swings 1995) e a pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) – Okabe 1933; Young; Dye; Wilkie, 1978). Comumente conhecidas como manchas foliares, essas doenças apresentam sintomas característicos, como a redução da área fotossintética, influência direta no crescimento da planta, depreciação no fruto devido à presença de lesões e principalmente, chegam a causar perdas estimadas em 60% e 70%, respectivamente, quando ocorrem em condições favoráveis ao seu desenvolvimento (BASHAN et al., 1982; LOPES; QUEZADO SOARES, 1997; LOPES, 2001; WILSON et al., 2002; VORHOLT, 2012).

O controle de bacterioses além de ser extremamente difícil, requer a adoção de medidas preventivas, como a aquisição de sementes e mudas sadias, eliminação de plantas voluntárias da área de plantio, cultivares resistentes e uso de produtos químicos utilizados em associação com cobre (LOPES ÁVILA, 2005; CLEMENTE; BOITEUX, 2012). No caso específico da pinta bacteriana, existem genótipos resistentes de tomateiro que possuem o gene

*Pto*, o qual confere resistência a *P. syringae* pv. *tomato*, presente na maioria das cultivares de tomate para processamento industrial (CLEMENTE; BOITEUX, 2012).

Em relação à mancha bacteriana, não há genótipos de tomateiro resistentes à doença. O controle químico, na maioria das vezes, não é efetivo (HERT et al., 2009), pois existem poucos produtos registrados para essa bacteriose, sendo geralmente utilizados em campo, compostos a base de cobre, sozinhos ou em combinação com fungicidas ditiocarbamatos, como mancozeb. Além disso, esses compostos apresentam pouca efetividade em condições ótimas para o desenvolvimento da doença, podendo desencadear um processo de seleção de diversos fitopatógenos resistentes aos ingredientes ativos (MARTIN; HAMILTON; KOPITTKKE, 2004; BYRNE et al., 2005; HERT et al., 2009).

O controle biológico mediado por microrganismos pode ser uma alternativa de manejo eficiente para reduzir ou eliminar o uso abusivo de agrotóxicos no cultivo do tomate. Além disso, pode proporcionar o equilíbrio no ambiente, bem como, proteger a planta hospedeira durante a existência do patógeno, para que a mesma não sofra danos expressivos (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

O uso de bactérias benéficas vem ganhando ênfase como alternativa para o controle de doenças que acometem a produção de culturas agronomicamente importantes (CAMPOS SILVA et al., 2008; PUSEY et al., 2009; ROMEIRO et al., 2010). Dentre elas, as bactérias endofíticas benéficas têm se destacado como promissoras no biocontrole de doenças e crescimento de plantas de diversas espécies, incluindo o tomate (BENHAMOU et al., 1998; CAMPOS SILVA et al., 2008; BARRETTI et al., 2009).

Como agentes de biocontrole, existem inúmeros trabalhos reportando o sucesso de bactérias endofíticas no controle biológico de diversos patógenos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, pois estas são capazes de reduzir ou prevenir os efeitos deletérios de patógenos, através de mecanismos de antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesas do hospedeiro (BETTIOL; GHINI, 1995; BARRETTI et al., 2009; LIN et al., 2013; PURNAWATI et al., 2014).

Dessa maneira, poderia se utilizar no controle de uma determinada doença, um microrganismo não patogênico, com necessidades nutricionais semelhantes as do patógeno, visando promover a competição por espaço e nutrientes, com o objetivo de reduzir a disseminação da doença, ou ainda, usufruir da capacidade que determinados microrganismos possuem, de produzir substâncias com ação antibiótica ou antifúngica, além de promover o crescimento e aumento da produtividade de plantas (SANTOS; VARAVALLO, 2011; POZZEBON; SANTOS, 2016). Assim, com a utilização de produtos de base biológica, é

possível reduzir o uso excessivo de insumos químicos e agrotóxicos, e conseqüentemente, os custos de produção, propiciando ao produtor rural, mais lucros ao final da produção da cultura (POZZEBON; SANTOS, 2016).

Essa interação de bactérias endofíticas com os tecidos internos de plantas sadias tem sido objeto de estudo em todo o mundo, visando elucidar os mecanismos de proteção e crescimento por elas promovidos (ROSEMBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; RYAN et al., 2008). Porém, esses estudos ainda carecem de informações a respeito dos mecanismos envolvidos nos processos de controle biológico, pois a maioria das pesquisas com essa temática não chegam a ser concluídas, e a busca por isolados bacterianos endofíticos continua com o intuito de se obter agentes potenciais eficazes no controle de bacterioses.

Como promotoras de crescimento de plantas, as bactérias endofíticas podem trazer benefícios por fornecer vitaminas essenciais à planta, aumentar a captação e solubilização de minerais, promover o ajuste osmótico, regulação dos estômatos e modificação da morfologia radicular (RYAN et al., 2008). Os efeitos à planta podem incluir o aumento da altura e área foliar, aumento do sistema radicular e produtividade, rápido crescimento e desenvolvimento, que resultam em um ganho geral de biomassa, e maior produtividade (STURTZ, 1995; PILLAY; NOWAK, 1997).

Com isso, objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial de biocontrole de bactérias endofíticas contra a pinta e a mancha bacteriana do tomateiro, elucidar alguns dos mecanismos de ação envolvidos no controle das duas doenças, e verificar o potencial de promoção de crescimento de plantas mediado por esses microrganismos.

## REFERÊNCIAS

- BARRETTI, P. B.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SOUZA, J. T. Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, edição especial, p. 2038-2044, 2009.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Long term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 9, p. 1143-1144, 1982.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Berlin, v. 204, n. 2, p. 153-168, Jan. 1998.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Princípios e Conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.
- BYRNE, J. M.; DIANESEA, A. C.; JI, P.; CAMPBELLA, H. L.; CUPPELS, D. A.; LOUWS, F.J.; MILLER, S. A.; JONES, J. B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biological Control**, San Diego, v. 32, n. 3, p. 408–418, 2005.
- CAMPOS SILVA, J. R.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, M. A. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.
- CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. 1. Ed. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2012.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Statistical Yearbook 2014**. ROMA: FAO, 2014.
- HALFELD-VIEIRA, B. DE A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBITI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Tropical Plant Pathology**, v. 29, n. 6, p. 638-643, 2004.
- HERT, A. P.; MARUTANI, M.; MOMOL, T.; ROBERT, P. D.; OLSON, S. M.; JONES, J. B. Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 18, p. 3323–3330, 2009.



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola: pesquisa mensal de prevenção e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 1-82, nov. 2016.

LIN, T.; ZHAO, L.; YANG, Y.; GUAN, Q.; GONG, M. Potential of endophytic bacteria from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against *Verticillium* wilt disease. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 7, n. 1, p. 139-146, 2013.

LOPES, C. A. Manejo integrado de bactérias fitopatogênicas. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. (Ed.) **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: Editora UFLA, 2001, p. 105-123.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. 2. Ed. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2005.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. 1. Ed. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 1997.

MARTIN, H.; HAMILTON, V.; KOPITCKE, R. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. **Plant disease**, St. Paul, Minnesota, v. 88, n. 9, p. 921-924, 2004.

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L. de; GOFFAU, M. de; HILMI, M.; DAM, B. V. **A cultura do tomate. Produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, Agrodok 17, 2006.

OKABE, N. Bacterial diseases of plants occurring in Formosa II. **Journal of the Society of Tropical Agriculture**, Taiwan, v. 5, n. 1, p. 26-36, 1933.

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a *Pseudomonas* bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 354-361, 1997.

POZZEBON, B. C.; SANTOS, J. Bactérias endofíticas: passado, presente e perspectivas futuras visando um futuro sustentável. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, v. 24, p. 115-119, 2016.

PURNAWATI, A.; SASRAHIDAYAT, I. R.; ABADI, A. L.; HADIASTONO, T. Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. **The Journal Of Tropical Life Science**, Indonesia, v. 4, n. 1, p. 33-36, 2014.

PUSEY, P. L.; STOCKWELL, V. O.; MAZZOLA, M. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, St. Paul, Minnesota, v. 99, n. 5, p. 571-581, 2009.

ROMEIRO, R. S.; LANNA FILHO, R.; MACAGNAN, D.; GARCIA, F. A. O.; SILVA, H. S. A. Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit

increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 11- 15, 2010.

ROSEMBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, Minnesota, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

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

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, n. 2, p. 257-263, 1995.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, Roma, v. 10, n. 12, p. 828–40, 2012.

WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; JI, P.; JONES, J. B.; CUPPELS, D. A. Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. **Phytopathology**, St. Paul, Minnesota, v. 92, n. 12, p. 1284–1292, 2002.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; WILKIE, J. P. Genus *Pseudomonas* Migula 1894. In: YOUNG J. M. et al. (Ed). **A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria**. Lincoln: New Zealand Journal of Agricultural Research, 1978, p.153-177.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1 Bactérias endofíticas no controle biológico e indução de resistência contra a mancha bacteriana do tomateiro.**

<sup>1</sup>Bruna Canabarro Pozzebon et al.

Artigo formatado de acordo com as normas de Australasian Plant Pathology

(Versão preliminar)

---

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Autor para correspondência: Ricardo Magela de Souza, e-mail: [rmagelas@dfp.ufla.br](mailto:rmagelas@dfp.ufla.br).

**RESUMO**

A mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*) pode causar perdas de até 60%, quando se manifesta em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. Assim, objetivou-se com esse estudo avaliar o potencial de controle biológico e indução de resistência de bactérias endofíticas, contra a mancha bacteriana do tomateiro. Para isso, foram realizados testes de patogenicidade, antagonismo *in vitro*, avaliação da severidade em casa de vegetação e estudos de mecanismos de indução de resistência, através da expressão do gene de defesa *SOD* e atividade de enzimas de defesa da rota dos fenilpropanóides (PAL e POX) e estresse oxidativo (SOD, APX e CAT). O teste de patogenicidade foi negativo para os 15 isolados endofíticos testados, confirmando que essas bactérias não são fitopatógenos de tomate. Os isolados Ufla – 285, 47, 51 e 50 apresentaram os maiores potenciais de antagonismo frente à bactéria fitopatogênica. Em casa de vegetação, cinco isolados reduziram a severidade da mancha bacteriana. O isolado Ufla - 22 foi o mais eficaz, reduzindo em 45% a severidade da doença. Este isolado apresentou efeito antagônico intermediário e, por isso, foi selecionado para as análises molecular e enzimática. O isolado Ufla – 22 apresentou efeito indutor de resistência, pois induziu o aumento da transcrição do gene *SOD* e proporcionou incremento na atividade das enzimas de defesa PAL, POX, SOD, APX e CAT, em plantas de tomate inoculadas com *X. vesicatoria*. Dessa forma, é possível comprovar a efetividade desse isolado no controle da mancha bacteriana, podendo o mesmo, ser utilizado em associação com outros métodos de controle no manejo dessa bacteriose em tomateiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Xanthomonas vesicatoria*, severidade, antagonismo.

## 1 INTRODUÇÃO

O tomate é a hortaliça de maior complexidade e risco econômico, devido aos problemas de ordem fitossanitária que podem acometer o ciclo de desenvolvimento da cultura (Luz *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2011; Alvarenga, 2013), como, por exemplo, doenças causadas por fitopatógenos, que reduzem a produtividade e oneram os custos de produção.

A mancha bacteriana pode ser causada por quatro espécies de *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans* (Quezado-Duval & Lopes, 2010). Das espécies desse complexo, *X. vesicatoria* apresenta distribuição mundial e atualmente, é uma das doenças mais difundidas, destrutivas e importantes do tomateiro para processamento industrial no Brasil, com ocorrência frequente em plantios irrigados ou não, por pivô central. As perdas podem chegar a 60%, quando a doença ocorre em condições favoráveis, e são resultantes da redução da área fotossintética e do crescimento da planta, da depreciação do fruto devido à presença de lesões e da redução da produção em decorrência direta dos sintomas (Bashan *et al.*, 1982; Lopes & Quezado Soares, 1997; Wilson *et al.*, 2002; Vorholt, 2012).

As estratégias de controle dessa doença são baseadas em combinações de práticas de manejo, como a aquisição de sementes e mudas saudáveis e a eliminação de plantas voluntárias e doentes da área de plantio (Lopes & Ávila, 2005; Clemente & Boiteux, 2012). Porém, a principal técnica de manejo adotada é a pulverização de produtos químicos à base de cobre, sozinhos ou em combinação com fungicidas ditiocarbamatos, como mancozeb, e mais recentemente, o uso de indutores de resistência (Hert *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2013). Contudo, esses compostos, além de tóxicos, apresentam pouca efetividade em condições ótimas para o desenvolvimento da doença, podendo desencadear um processo de seleção de diversos fitopatógenos resistentes aos ingredientes ativos (Martin *et al.*, 2004; Byrne *et al.*, 2005; Hert *et al.*, 2009).

Dessa forma, o controle biológico mediado por microrganismos, quando integrado às demais práticas de manejo já utilizadas na cultura, pode ser uma alternativa de manejo eficiente para reduzir ou eliminar o uso excessivo de agrotóxicos, aumentar a produtividade e a qualidade do produto final. Além disso, pode proporcionar o equilíbrio no ambiente, bem como, proteger a planta hospedeira durante a existência do patógeno, para que a mesma não sofra perdas expressivas (Santos & Varavallo, 2011).

Nesse contexto, estudos de biocontrole com bactérias benéficas vêm ganhando ênfase como alternativa para o controle de doenças que acometem a produção de culturas

agronomicamente importantes (Campos Silva *et al.*, 2008; Pusey *et al.*, 2009; Romeiro *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015). Assim, poderia ser utilizado no controle de uma determinada doença, um microrganismo não patogênico, com necessidades nutricionais semelhantes as do patógeno, visando promover a competição por espaço e nutrientes, com o objetivo reduzir a disseminação da doença, ou ainda, usufruir da capacidade que determinados microrganismos possuem, de produzir substâncias com ação antibiótica ou antifúngica (Santos & Varavallo, 2011; Pozzebon & Santos, 2016).

Existem inúmeros trabalhos reportando o sucesso de bactérias endofíticas no controle biológico e indução de resistência de plantas a diversos patógenos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Barretti *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Purnawati *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2017). Esses microrganismos atuam como biocontroladores através de mecanismos de antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesas do hospedeiro (Bettiol & Ghini, 1995). Por exemplo, as bactérias endofíticas *Bacillus pumilus* e *B. amyloliquefaciens*, foram testadas no controle biológico da pinta e da mancha bacteriana, sendo capazes de induzir a resistência de plantas de tomate e reduzir o número de lesões das duas doenças (Lanna Filho *et al.* 2013a; 2013b). Plantas de tomate inoculadas com *B. subtilis* CBR05 tiveram aumento significativo nas atividades das enzimas de defesa SOD, CAT, POX e PPO (Chandrasekaran & Chun, 2016a).

Dessa forma, o uso de bactérias endofíticas na agricultura é uma alternativa no manejo de doenças de plantas. Com a utilização de produtos de base biológica em integração com as práticas convencionais de manejo, é possível reduzir o uso excessivo de insumos químicos e agrotóxicos, diminuir o período de reentrada na lavoura e/ou casa de vegetação para tratamentos culturais, evitar o aparecimento de populações resistentes de patógenos, reduzir os custos de produção e aumentar a produtividade da cultura, resultando em um produto final de maior qualidade e com melhor custo-benefício para o produtor rural. Com isso, objetivou-se com esse trabalho, avaliar o potencial de biocontrole e indução de resistência de bactérias endofíticas, contra a mancha bacteriana do tomateiro.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

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

As bactérias endofíticas utilizadas nesse estudo são provenientes da coleção de isolados bacterianos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Departamento de Fitopatologia,

da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram selecionadas para o presente estudo 15 bactérias endofíticas, que em estudos preliminares mostraram potencial para o controle biológico (Tabela 1). O isolado patogênico referência de *X. vesicatoria* EH 2010 – 41, foi cedido pela Dra. Alice Maria Quezado da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças - Brasília, DF). Essa espécie foi escolhida para desenvolvimento dos experimentos do presente estudo, por apresentar distribuição mundial em cultivos de tomate (Quezado-Duval & Lopes, 2010).

TABELA 1. Bactérias endofíticas utilizadas como potenciais agentes de biocontrole da mancha bacteriana do tomateiro.

<b>Isolado (bactéria endofítica)</b>	<b>Origem:/ Ano</b>
<i>Paenibacillus macerans</i> (Ufla - 37 e 47)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 50)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)/ Lanna Filho <i>et al.</i> (2013a)
<i>Bacillus pumillus</i> (Ufla - 2, 12, 20, 39 e 51)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus sphaericus</i> (Ufla - 45)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus</i> sp. (Ufla - 24)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus pumillus</i> (Ufla - 6)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)/ Lanna Filho <i>et al.</i> (2013a)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 22)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus megaterium</i> (Ufla - 7)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Paenibacillus gordonae</i> (Ufla - 40)	Campos Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 285)	Medeiros <i>et al.</i> (2011)

As bactérias endofíticas preservadas a -80°C em peptona glicerol a 30% (v/v) no Departamento de Fitopatologia da UFLA, foram retiradas do congelamento, semeadas sobre meio de cultura 523 sólido de Kado & Heskett (1970), por meio de estrias paralelas (Romeiro, 2001), e incubadas em câmara de crescimento tipo BOD, a 28 °C por 24 h, para crescimento. Após a obtenção das colônias puras em placas de Petri, foi realizada a preservação das bactérias, através da repicagem para tubos contendo meio 523 sólido inclinado (Tuite, 1969; Kiraly *et al.*, 1974).

## 2.2 Teste de patogenicidade

Para verificar se as 15 bactérias endofíticas escolhidas para o presente estudo apresentavam características de patogenicidade, foram utilizadas plantas de fumo, tomate e pimentão. As bactérias endofíticas foram cultivadas em meio sólido 523, por 24 h, a 28 °C. Posteriormente, foi adicionada às placas de Petri, solução salina de NaCl 0,85%, e feita a raspagem do crescimento bacteriano, com alça de Drigalski.

A concentração da suspensão foi ajustada para  $OD_{540} = 0,5$  em espectrofotômetro ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho *et al.*, 2009). As plantas foram inoculadas por infiltração da suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da face abaxial da folha, com uma seringa hipodérmica fina (Klement, 1964), e mantidas por 24 horas em casa de vegetação.

O ensaio foi conduzido em três repetições, utilizando-se como controle negativo plantas de fumo, tomate e pimentão com 30 dias de idade, inoculadas com solução salina de NaCl 0,85% e, como controle positivo, plantas de fumo, tomate e pimentão inoculadas com o isolado referência de *Pseudomonas syringae* pv. *garceae* (Psg CFBP 1634), que em testes anteriores apresentou sintomas de HR, obtido da “*Collection Français de Bactéries Phytopathogènes*” (CFBP). Após 24 h da infiltração da suspensão bacteriana, foi avaliada a presença ou ausência de sintomas típicos de Reação de Hipersensibilidade (HR), como a necrose e dessecamento do tecido (Mariano, 2000; Romeiro, 2001).

## 2.3 Potencial de antagonismo *in vitro*

O teste de antibiose foi realizado como proposto por Vidaver *et al.* (1972), com adaptações. O método utilizado foi o da dupla camada de meio de cultura em placas de Petri (60 x 15 mm). Para isso, uma camada básica de 6 mL de meio de cultura sólido 523 foi formada nas placas de Petri.

Os isolados endofíticos foram cultivados em meio 523 líquido e mantidos sob agitação constante em Shaker durante 12 h, a 38 rpm e 28 °C. Em seguida, foram repicados em pontos equidistantes, três isolados endofíticos, mais o tratamento controle (água destilada e esterilizada). Foram semeados 0,5 µL da suspensão de cada isolado por placa de Petri, e incubados por 12 h a 28 °C, tempo suficiente para crescimento evidente das colônias.

Decorrido o tempo de incubação, as colônias foram mortas pela exposição a vapores de clorofórmio durante uma hora, seguido de exposição direta à luz ultravioleta (UV) por mais uma hora. Em seguida, cada placa contendo colônias inativadas de bactérias endofíticas



recebeu uma sobre-camada de meio de cultura 523 semi-sólido fundente (45 °C, contendo ágar 0,8%), ao qual foram incorporados 100 µL de suspensão da bactéria fitopatogênica *X. vesicatoria*. Após a solidificação da sobre-camada de meio, as placas foram incubadas a 28 °C por 48 h, quando foi avaliada a inibição ou não do crescimento da bactéria fitopatogênica (Vidaver *et al.*, 1972).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições para cada isolado endofítico. Havendo halo de inibição, o mesmo foi mensurado em centímetros. Os dados foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011), submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo teste *F*, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ). Esse experimento foi realizado duas vezes.

## **2.4 Proteção de plantas de tomateiro contra a mancha bacteriana**

### **2.4.1 Bacterização das sementes com bactérias endofíticas e obtenção das mudas**

Inicialmente foi feita a desinfestação superficial de sementes da cultivar de tomate suscetível Santa Clara, através do método da tríplice lavagem (1 minuto em álcool 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio 2% e três lavagens em água destilada e esterilizada) (Pinho *et al.*, 2009). Posteriormente as sementes foram secas e acondicionadas em copos plásticos de 20 mL. Culturas bacterianas endofíticas com crescimento de 24 h foram postas em suspensão. Para isso, adicionou-se às colônias cultivadas em meio 523, solução salina de NaCl 0,85%, e depois, foi feita a raspagem, com alça de Drigalski, até a obtenção de uma suspensão homogênea de células bacterianas, ajustada em espectrofotômetro para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho *et al.*, 2009).

A suspensão bacteriana foi adicionada aos copos plásticos, contendo aproximadamente 0,3 g de semente cada um, de maneira a cobrir completamente as sementes. A bacterização das sementes ocorreu por agitação em Shaker, durante 24 h a 38 rpm e 28 °C. Como controle negativo, as sementes foram imersas em solução salina de NaCl 0,85%. Após a bacterização, as sementes foram semeadas em bandejas, contendo mistura de solo, esterco e areia, na proporção 1:1:1 (v/v/v) e cultivadas em casa de vegetação com temperatura e umidade parcialmente controladas ( $\pm 25$  °C e UR = 80%). Quando as plântulas apresentaram duas folhas verdadeiras, realizou-se o transplântio, mantendo uma planta por vaso.

### 2.4.2 Preparo do inóculo e inoculação de *X. vesicatoria*

O preparo do inóculo constou do crescimento prévio de *X. vesicatoria* em meio de cultura 523 por 48 h, a 28 °C, em câmara de crescimento tipo BOD. Suspensões bacterianas de *X. vesicatoria*, ajustadas para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho *et al.*, 2009), foram atomizados sobre plantas de tomate apresentando quatro folhas verdadeiras, mantidas em câmara úmida 24 h antes e após a inoculação.

Considerando o surgimento dos primeiros sintomas da doença, foram realizadas as avaliações de severidade da doença, em quatro folhas verdadeiras de cada planta de tomate, previamente etiquetadas para manter o mesmo padrão de avaliação, com intervalos de quatro dias entre uma avaliação e outra, totalizando cinco avaliações, utilizando-se escala diagramática proposta por Peretto & Silva (2002).

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), com três repetições, sendo cada parcela experimental composta por duas plantas. Para comparar as bactérias endofíticas quanto à redução da severidade da doença nas plantas, realizou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), utilizando-se a fórmula abaixo:

$$AACPSD = \sum_{i=1}^{n-1} (Y_i + Y_{i+1})/2 * (T_{i+1} - T_i),$$

Onde:

$n$  é o número de avaliações;  $Y$  a severidade da doença;  $T$  o tempo quando da avaliação da doença;  $(Y_i + Y_{i+1})$  a altura média do retângulo entre os pontos  $Y_i$  e  $Y_{i+1}$ ; e  $T_{i+1} - T_i$  a diferença da base do retângulo entre os pontos  $T_{i+1}$  e  $T_i$ .

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011), em que os valores de AACPSD de cada bactéria endofítica, foram submetidos ao teste  $F$  na análise de variância e as médias, quando significativas, agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

Foi estimada também a taxa de progresso da doença ( $r$ ), determinada pelo parâmetro  $b$  da equação de regressão ( $p \leq 0.01$ ). As análises de regressão foram realizadas utilizando o *software* Excel. Esse experimento foi realizado duas vezes.

## 2.5 Análises moleculares e bioquímicas da resposta de defesa induzida por bactérias endofíticas em tomateiro contra a mancha bacteriana

### 2.5.1 Preparo das plantas e inoculação

O isolado Ufla - 22 (*B. amyloliquefaciens*) foi selecionado para as análises moleculares e bioquímicas da resposta de defesa induzida, por apresentar maior eficiência no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação. A verificação do seu efeito indutor ocorreu por meio da análise de expressão do gene de defesa *SOD* e atividade de enzimas de defesa da planta da rota dos fenilpropanóides e estresse oxidativo.

O isolado Ufla - 22 foi cultivado por 24 h, a 28 °C, e posto em suspensão, através da raspagem do crescimento bacteriano com solução salina de NaCl 0,85%, com concentração da suspensão bacteriana ajustada em espectrofotômetro para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho *et al.*, 2009). Posteriormente, 0,3 g de sementes de tomate foram bacterizadas por 24 h em Shaker, com agitação constante a 38 rpm e 28 °C, e semeadas em vasos de 3 L, contendo mistura de solo, esterco e areia, na proporção 1:1:1 (v/v/v), previamente autoclavados. Como controle negativo, as sementes foram imersas em solução salina de NaCl 0,85%.

Esse ensaio constou de três tratamentos: T1) Ufla - 22 + *X. vesicatoria* (XV); T2) *X. vesicatoria* (XV); T3) Sem inoculação.

Ao apresentarem quatro folhas verdadeiras, as plantas dos tratamentos T1 e T2 foram inoculadas por aspersão com *X. vesicatoria* ( $OD_{540} = 0,5$ ) e mantidas em câmara úmida 24 h antes e após a inoculação. Amostras de folhas de tomateiro de cada um dos três tratamentos foram coletadas às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação (hai) com *X. vesicatoria*. As mesmas foram armazenadas individualmente em sacos plásticos previamente identificados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido, e em seguida, as amostras destinadas a análise da expressão gênica e atividade enzimática foram mantidas em temperatura de -20 °C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), com três repetições e três plantas para cada tempo de coleta.

### 2.5.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

O material vegetal coletado foi macerado em nitrogênio líquido e, aproximadamente 0,24 g de cada amostra macerada, utilizado para extração do RNA total pelo método *TRIzol RNA Isolation*, seguindo o protocolo para tecidos de plantas ([http://afgc.stanford.edu/afgc\\_html/site2Rna.htm#isolation](http://afgc.stanford.edu/afgc_html/site2Rna.htm#isolation)). A integridade do RNA foi

visualizada em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed<sup>TM</sup>, e as amostras quantificadas em espectrofotômetro NanoVue<sup>TM</sup> Plus Spectrophotometer.

Posteriormente, para garantir a qualidade e apenas a presença de RNA, as amostras foram tratadas com DNASE, com o *Kit TURBO DNA-free*<sup>TM</sup> (Invitrogen), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante, e novamente quantificadas em NanoVue<sup>TM</sup> Plus Spectrophotometer.

Para a síntese de cDNA, utilizou-se o Kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems<sup>TM</sup>), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram mantidas em temperatura de -20 °C até o uso.

Os *primers* para análise da expressão gênica utilizados nesse estudo foram: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - GAPDH* F: 5'-ACCACAAATTGCCTTGCTCCCTTG-3'; *GAPDH* R: 5'-ATCAACGGTCTTCTGAGTGGCTGT-3', utilizado como gene de referencia na normalização da expressão gênica em tomateiro; e *Superóxido dismutase - SOD* F: 5'-CTGGGAATCTATGAAGCCCAACGGA-3'; *SOD* R: 5'-CAAATTGTGTTGCTGCAGCTGCCTT-3', utilizado como gene de defesa expresso na rota de estresse oxidativo da planta, ambos desenhados por Mascia *et al.* (2010).

Para análise da RT-qPCR, foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems) e o sistema de detecção foi o *SYBR Green*. Para cada reação foi utilizado 0,5 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* a 10 µM e 2,5 µL de *SYBR*<sup>®</sup> *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), para um volume final de amostra de 5 µL. A amplificação foi conduzida em incubações iniciais por 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de *melting* foi determinada após o término dos ciclos de reações de cada produto amplificado entre 72 e 95 °C.

Para cada gene em estudo, o experimento foi conduzido a partir de cDNAs obtidos de três repetições biológicas, com três replicatas técnicas, sendo os resultados normalizados, usando os CTs (Ciclo *Threshold*), obtidos pela expressão do gene constitutivo *GAPDH*. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método CT comparativo (Livak & Schmittgen, 2001).

### 2.5.3 Análise da atividade de enzimas de defesa da planta

Para a obtenção dos extratos enzimáticos utilizados na determinação da atividade das enzimas PAL (Fenilalanina amônia-liases) e POX (Peroxidase), amostras de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido em almofariz, até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF), na proporção de 1,0 mL de tampão para 0,2 g de pó obtido. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade da PAL foi iniciada após a adição de 10 µL do extrato enzimático a uma mistura contendo 140 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 50 µL de L-fenilalanina 50 mM. A mistura da reação foi incubada a 37°C durante 20 minutos. A absorvância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 280 nm e o coeficiente de extinção molar de 10.000 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Zucker, 1965) foi utilizado para calcular a atividade da PAL, a qual foi expressa em µM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Determinou-se a atividade da POX através da oxidação do guaiacol (Kar & Mishra, 1976). Para isso, foram adicionados 5 µL do extrato enzimático, a uma mistura de 115 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 40 µL de guaiacol 50 mM e 40 µL de peróxido de hidrogênio 125 mM. Após a incubação a 30 °C por 10 minutos, a absorvância foi medida a 480 nm em espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi utilizado para calcular a atividade da POX (Chance & Maehley, 1955), a qual foi expressa em mM de tetraguaiacol produzido por min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para a obtenção dos extratos enzimáticos utilizados na determinação da APX (Ascorbato peroxidase), CAT (Catalase) e SOD (Superóxido dismutase), amostras de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido em almofariz, até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), contendo 10 mM de EDTA, 200 mM de ácido ascórbico e água, na proporção de 1,0 mL de tampão para 0,2 g de pó obtido. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977), em meio de incubação composto por 30 µL do extrato foliar, contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 40 µL de metionina 70 mM, 15 µL de azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 1 mM, 2 µL de EDTA 10 mM, 2 µL de riboflavina 0,2 mM e 11 µL de água (Del Longo *et al.*, 1993).

Após a incubação por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 15 W, realizou-se a leitura a 560 nm. Uma unidade da SOD correspondeu à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano & Asada (1981), em que foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a uma solução contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10 µL de ácido ascórbico 10 mM, 10 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 70 µL de água. A atividade enzimática foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 3 min a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, foi utilizado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak & Horst (1991), em que foi avaliado o decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos a 25 °C. Para isso, foram adicionados 10 µL de extrato enzimático, contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 80 µL de água e 10 µL de peróxido de hidrogênio 250 mM. A atividade enzimática foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm durante 3 min a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson *et al.*, 1995) foi utilizado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A proteína total de cada extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados da atividade das enzimas PAL, POX, APX, CAT e SOD foram submetidos à análise de variância, e quando significativas pelo teste *F*, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

### 3 RESULTADOS

Nenhum dos 15 isolados endofíticos induziram sintomas de HR nas plantas de fumo, tomate ou pimentão sendo, portanto, considerados não patogênicos. *Pseudomonas syringae* pv. *garceae*, utilizada como controle positivo, induziu HR nas folhas das três plantas testadas em 24 h. A solução salina (NaCl 0,85%), utilizada como controle negativo, também não induziu os sintomas de HR (Figura 1).

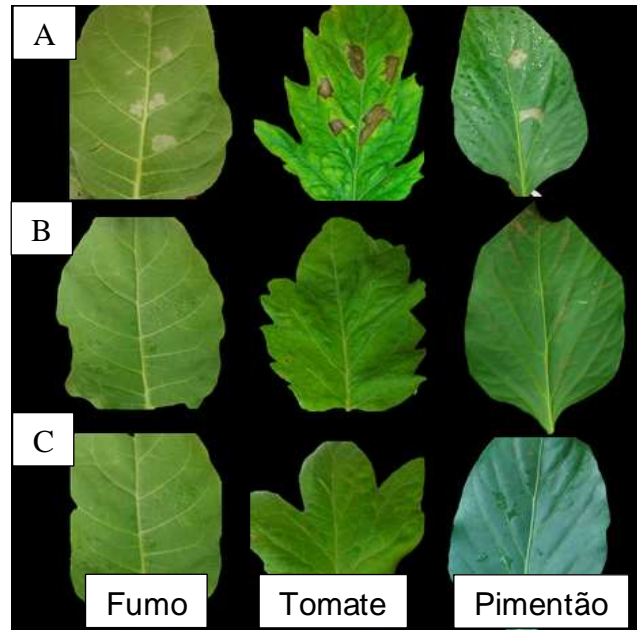


FIGURA 1. Teste de patogenicidade: (A) Controle positivo (*Psg*) apresentando sintomas típicos de HR nas três plantas indicadoras; (B) Controle negativo (solução salina NaCl 0,85%), sem a presença de HR; (C) Isolado Ufla - 22, demonstrando a ausência de sintomas típicos de HR.

Dos 15 isolados testados, oito inibiram eficientemente o crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria* (Tabela 2). Destes, os isolados Ufla - 285, 47, 51 e 50 (Figura 2A e 2B) foram os que apresentaram a maior atividade inibitória frente à bactéria fitopatogênica, exibindo halos de inibição de 0,98, 0,90, 0,80 e 0,76 cm, respectivamente, quando comparados com o tratamento controle (água destilada e esterilizada).

TABELA 2. Atividade antagônica de bactérias endofíticas ao crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria*.

<b>Antibiose <i>in vitro</i></b>	
<b>Isolado Ufla -</b>	<b>Média do Halo de Inibição (cm)</b>
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 285	0,98 a*
<i>P. macerans</i> - 47	0,90 a
<i>B. pumillus</i> - 51	0,80 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 50	0,76 a
<i>B. pumillus</i> - 39	0,64 b
<i>B. pumillus</i> - 20	0,64 b
<i>P. gordonae</i> - 40	0,54 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 22	0,48 b
Controle	0,00 c
<i>B. pumillus</i> - 12	0,00 c
<i>Bacillus</i> sp. - 24	0,00 c
<i>B. pumillus</i> - 6	0,00 c
<i>B. megaterium</i> - 7	0,00 c
<i>B. pumillus</i> - 2	0,00 c
<i>P. macerans</i> - 37	0,00 c
<i>B. sphaericus</i> - 45	0,00 c
<b>CV (%)</b>	<b>30,62</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

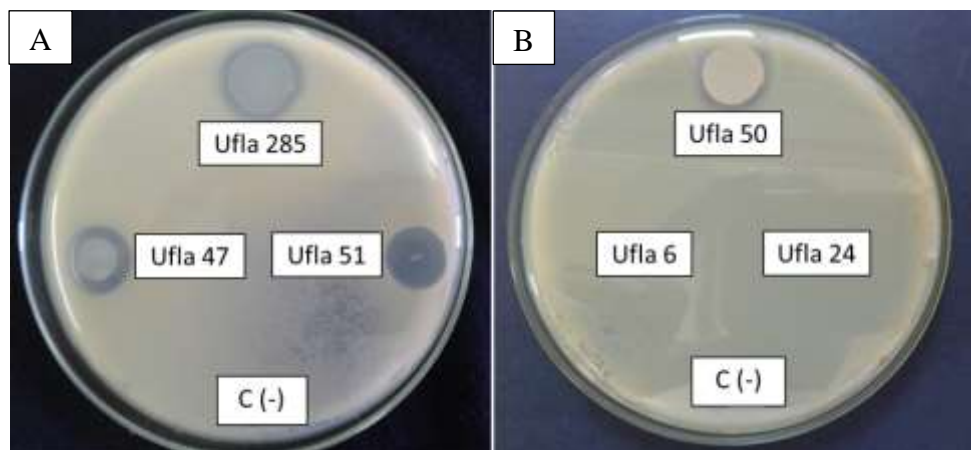


FIGURA 2. (A) Inibição do crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria*, pelos isolados endofíticos Ufla – 285, 47 e 51, comparados ao controle (C (-)); (B) Inibição do crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria* pelo isolado endofítico Ufla - 50, e isolados Ufla - 6, 24, e tratamento controle (C(-)), sem potencial de antagonismo.



Em relação ao controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação, cinco isolados, Ufla - 22, 7, 45, 51 e 47 se destacaram por reduzir a severidade da doença em 45%, 37%, 35%, 35% e 28%, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle (100% de doença) (Figura 3). Além disso, três desses isolados, Ufla - 22, 51 e 47 apresentaram também potencial de antagonismo *in vitro* (Tabela 3).

TABELA 3. Isolados endofíticos no controle da severidade da mancha bacteriana em folhas de tomateiro em casa de vegetação (Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade da Doença - AACPSD), taxa de progresso da doença no tempo e inibição do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria*.

Isolado Ufla -	AACPSD	Taxa de progresso da doença	Halo de inibição
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 22	114,27 a*	0,564**	+
<i>B. megaterium</i> - 7	130,51 a	0,691	-
<i>B. sphaericus</i> - 45	134,55 a	0,826	-
<i>B. pumillus</i> - 51	135,21 a	0,782	+
<i>P. macerans</i> - 47	149,67 a	0,886	+
<i>P. macerans</i> - 37	156,56 b	0,889	-
<i>Bacillus</i> sp. - 24	160,02 b	0,747	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 285	167,00 b	0,859	+
<i>B. pumillus</i> - 2	167,62 b	0,959	-
<i>B. pumillus</i> - 20	168,15 b	0,860	+
<i>B. pumillus</i> - 39	185,54 b	0,892	+
<i>B. pumillus</i> - 6	192,55 b	1,056	-
Controle	207,79 c	1,285	-
<i>P. gordonae</i> - 40	219,67 c	1,073	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 50	245,13 d	0,072	+
<i>B. pumillus</i> - 12	277,63 d	1,271	-
<b>CV (%)</b>	<b>14,52</b>		

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

\*\* Significância na análise de regressão  $p \leq 0,01$ .

(+) = Presença de halo de inibição (-) = Ausência de halo de inibição.

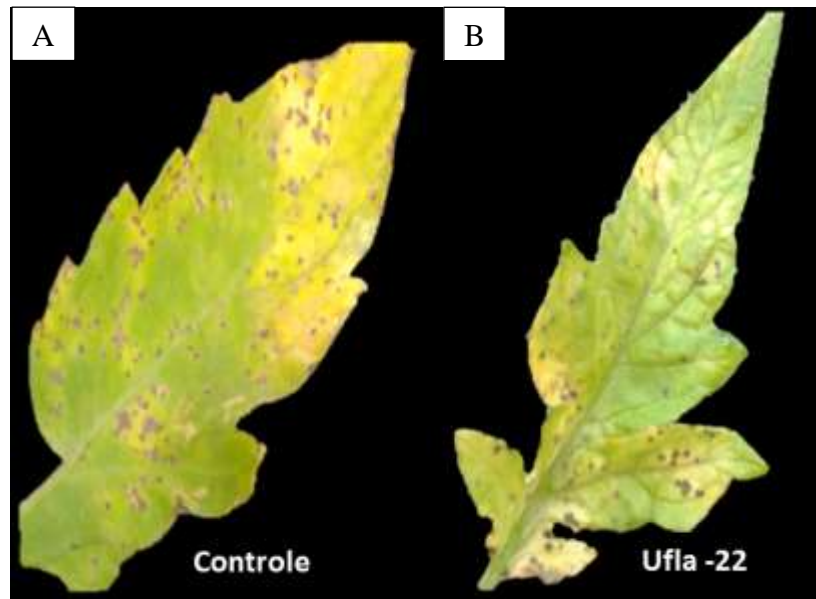


FIGURA 3. Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) em folhas de tomateiro oriundas de sementes bacterizadas com Solução Salina de NaCl 0,85% (Controle negativo) (A) e bacterizadas com o isolado endofítico Ufla – 22 (B).

A bactéria endofítica Ufla – 22, após a inoculação de *X. vesicatoria* (T1), induziu ao aumento dos transcritos do gene *SOD* em relação às plantas de tomate controle não inoculadas (T3) e inoculadas apenas com a bactéria fitopatogênica (T2), às 8 hai. A partir das 16 hai, de maneira geral, não houve diferença na análise dos transcritos do gene *SOD* em plantas de tomate inoculadas ou não com a bactéria endofítica (Figura 4).

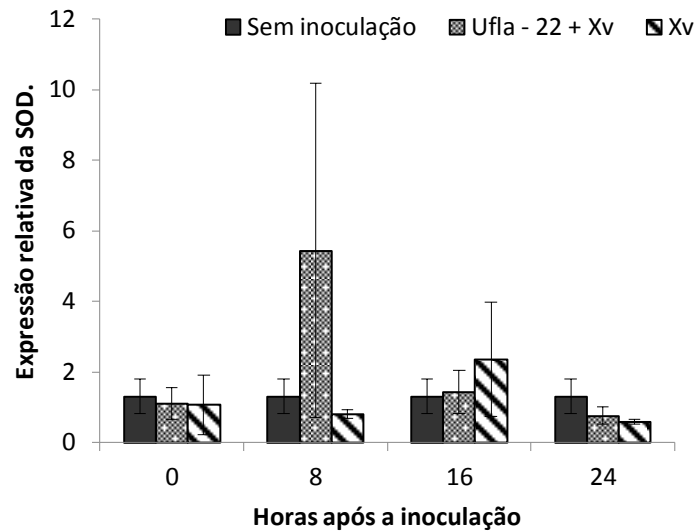


FIGURA 4. Expressão quantitativa relativa por RT-qPCR do gene *Superóxido dismutase (SOD)* em plantas de tomate bacterizadas ou não com o isolado endofítico Ufla – 22 às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação com a bactéria *Xanthomonas vesicatoria (Xv)*. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*.

Houve aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de tomate bacterizadas com o isolado Ufla – 22, às 8 hai com *X. vesicatoria*, em relação às plantas inoculadas apenas com o patógeno e não inoculadas (Figura 5A).

De forma semelhante à PAL, plantas de tomate tratadas com o isolado endofítico Ufla – 22 e inoculadas com *X. vesicatoria*, tiveram maior atividade da POX às 8 hai, diferindo dos demais tratamentos (Figura 5B).

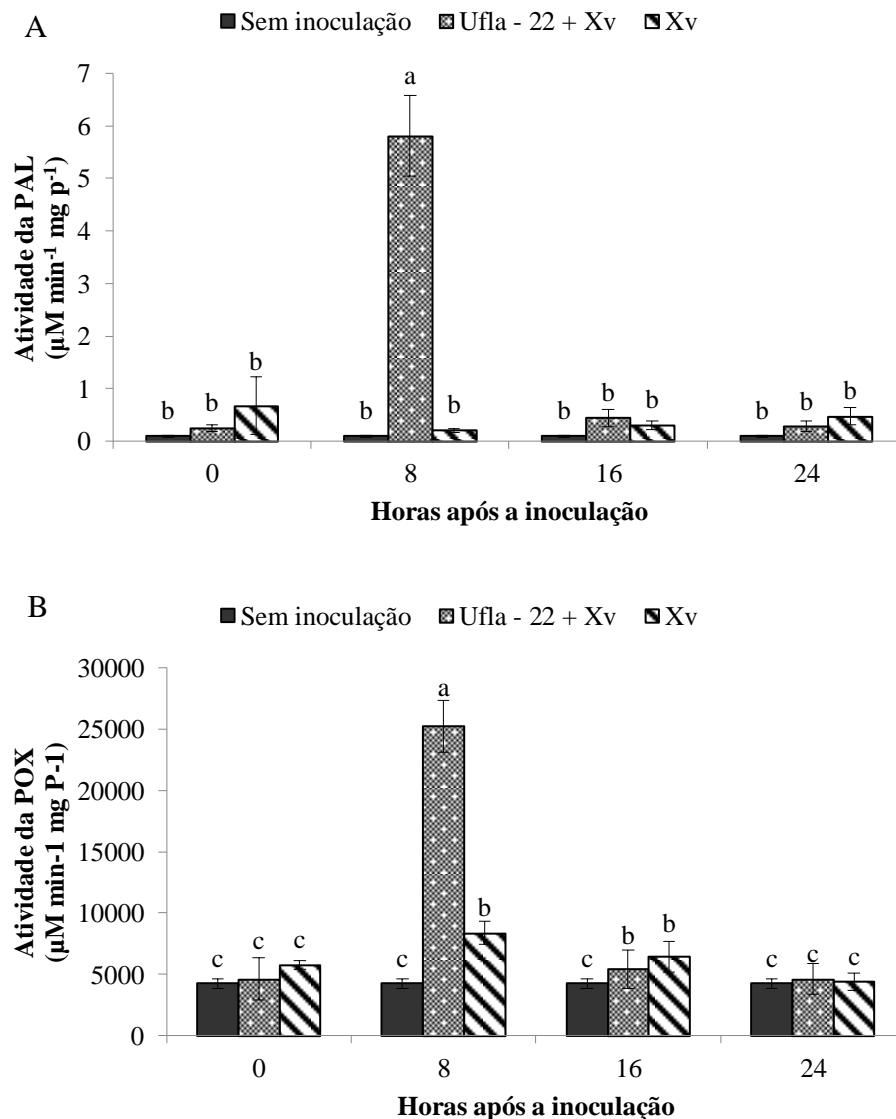


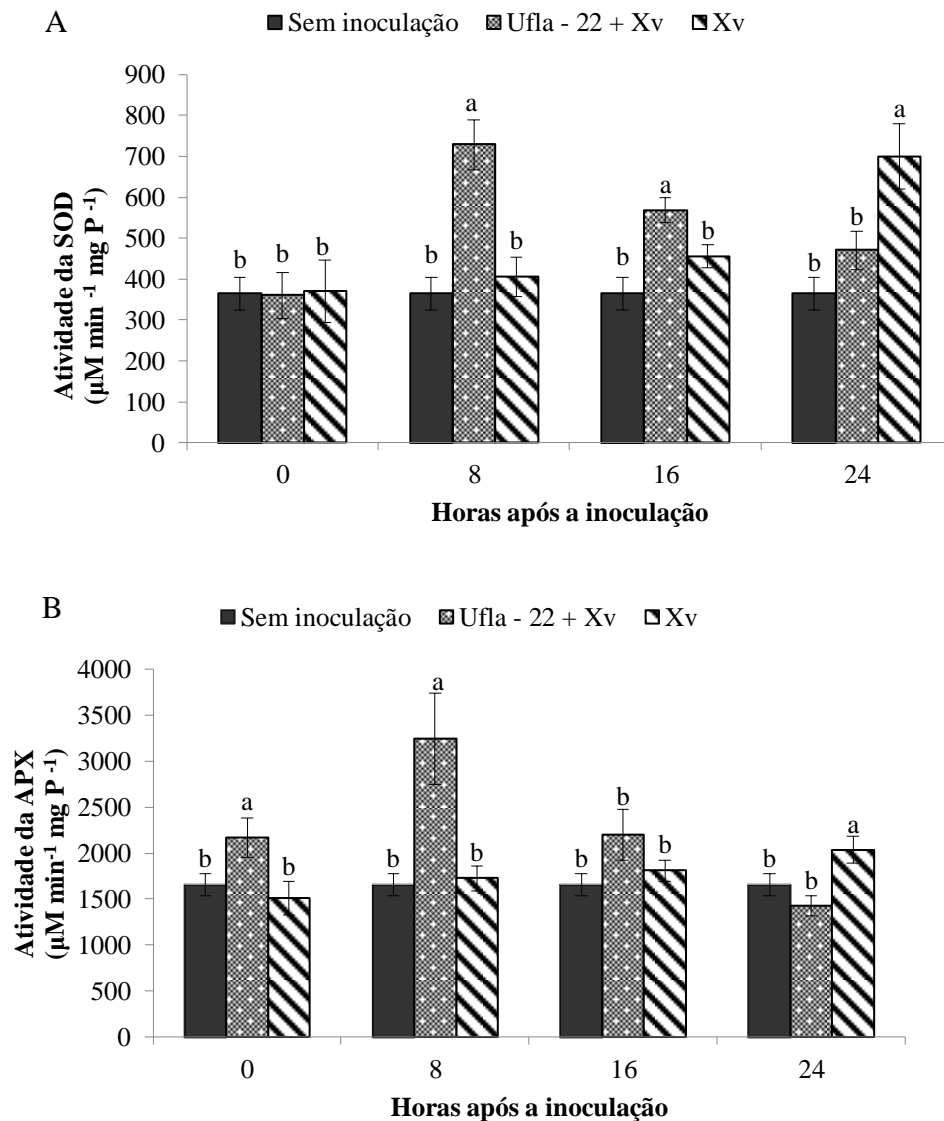
FIGURA 5. Atividade das enzimas de defesa fenilalanina amônia-liase (PAL) (A) e peroxidase (POX) (B), em plantas de tomate bacterizadas ou não com o isolado Ufla – 22 às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas vesicatoria* (Xv). Como controle foram utilizadas plantas não inoculadas.

As plantas bacterizadas com o isolado endofítico Ufla – 22 e inoculadas com *X. vesicatoria* apresentaram maior atividade da enzima SOD às 8 e 16 hai, quando comparadas com as plantas não inoculadas com a endofítica. Nas plantas inoculadas apenas com a bactéria fitopatogênica, houve um aumento da atividade da SOD às 24 hai (Figura 6A).

As plantas de tomate bacterizadas com o isolado endofítico Ufla – 22 e inoculadas com a bactéria fitopatogênica apresentaram aumento na atividade enzimática da APX no

momento da inoculação e às 8 hai, sendo também superior aos demais tratamentos às 16 hai. As plantas inoculadas apenas com a bactéria fitopatogênica apresentaram aumento da atividade da APX às 24 hai (Figura 6B).

Os resultados obtidos com a análise da atividade da CAT foram relativamente semelhantes aos da atividade da APX. Nesse caso a bactéria endofítica Ufla – 22 proporcionou maior atividade enzimática em plantas de tomateiro as 0 e 8 hai, permanecendo alta às 16 hai. Já às 24 hai, plantas inoculadas apenas com *X. vesicatoria* tiveram aumento da atividade enzimática, diferindo dos demais tratamentos (Figura 6C).



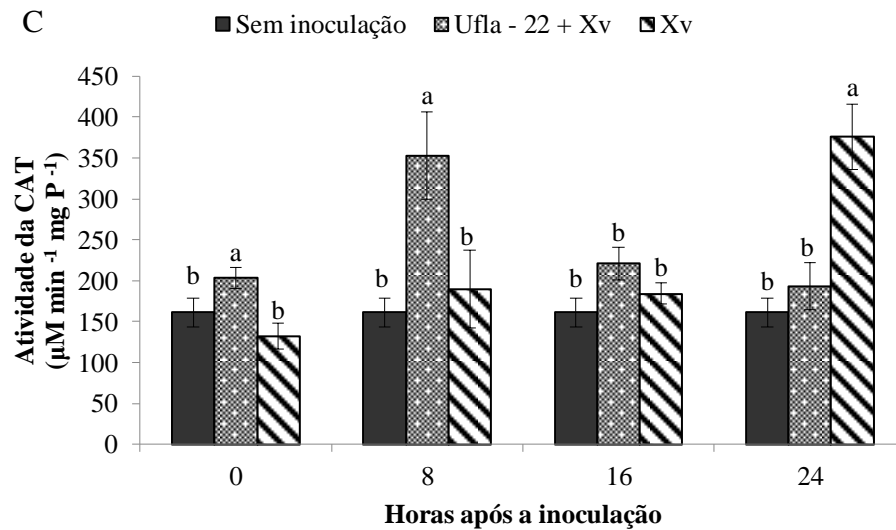


FIGURA 6. Atividade de enzimas de defesa: superóxido dismutase (SOD) (A), ascorbato peroxidase (APX) (B) e catalase (CAT) (C), em plantas de tomate bacterizadas ou não com o isolado Ufla – 22 às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas vesicatoria* (Xv). Como controle foram utilizadas plantas não inoculadas.

#### 4 DISCUSSÃO

O uso de bactérias endofíticas é uma das alternativas mais confiáveis e sustentáveis dos métodos de controle biológico, tanto econômica quanto ecologicamente (Ryan *et al.*, 2008; Nagendran *et al.*, 2013). Estratégias de manejo de pragas e doenças que utilizam microrganismos endofíticos representam uma área emergente na proteção de plantas. Além disso, membros do gênero *Bacillus* são potenciais agentes de controle biológico, devido à sua atividade antagonista de amplo espectro contra fungos e bactérias, alta capacidade de produção de endósporos e resistência a condições desfavoráveis do ambiente e hospedeiro (Li *et al.*, 2008; Raddadi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014; Ferraz *et al.*, 2015; Fousia *et al.*, 2015).

Os 15 isolados endofíticos utilizados neste trabalho apresentaram resultados negativos para o teste de hipersensibilidade em folhas de fumo, tomate e pimentão, confirmando a sua natureza não fitopatogênica, necessária aos candidatos a agentes de controle biológico.

Com relação ao efeito antagonista, 53% dos isolados inibiram o crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria*, demonstrando que a antibiose não foi um fenômeno limitado (Tabela 2). Corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, Barretti *et al.* (2012) verificaram que

os isolados endofíticos UFV-E17 e UFLA 91-BS produziram halos de inibição quando confrontados com *Ralstonia solanacearum* no teste de antibiose. Já no estudo realizado por Hassan & Zyton (2017), os bioagentes *B. subtilis*, *P. fluorescens* e *P. putida*, isolados de folhas de pimenta, inibiram o crescimento de *X. vesicatoria* em 1,9 mm, 2,9 mm e 3,4 mm, respectivamente.

A antibiose está geralmente relacionada à síntese de metabólitos secundários, como por exemplo, lipopeptídeos, das famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas (Ongena *et al.*, 2005). Além disso, espécies de *Bacillus* são conhecidas como produtoras muito eficientes de antibióticos, sendo 4 – 5% de seu genoma, dedicados à síntese de moléculas antibióticas e compostos antimicrobianos estruturalmente diversos (Stein, 2005). Contudo, as moléculas envolvidas no processo de antibiose não foram caracterizadas nesse estudo, porém, é possível que as mesmas façam parte dos grupos supramencionados, já que os isolados desse estudo, em sua maioria, pertencem ao gênero *Bacillus*.

Naturalmente, apenas a antibiose não eleva o isolado ao “*status*” de um bom agente de biocontrole, pois outros fenômenos podem ocorrer com a introdução do mesmo, quando exposto a condições ambientais. Isso foi reportado por Romeiro *et al.* (2005), que ao confrontarem por antibiose um isolado de *Bacillus pumilus* contra os patógenos *P. syringae* pv. *tomato*, *X. vesicatoria*, *Alternaria solani* e *Corynespora cassiicola*, o mesmo não apresentou efeito inibitório. Porém quando a bactéria entrou em contato com o sistema radicular de plantas de tomate, promoveu a indução de resistência, reduzindo a severidade das doenças causadas por esses patógenos.

Em casa de vegetação, 12 isolados (80% do total) manifestaram efeito controlador sobre a mancha bacteriana. Desses, cinco isolados (33,3% do total) foram promissores no controle da doença, diferindo estatisticamente dos demais. Esse resultado pode ser confirmado através da taxa de progresso da doença, pois as bactérias que apresentaram as menores taxas de progresso da doença apresentaram também as menores AACPSDs (Tabela 3). Cinco isolados apresentaram as menores AACPSDs, diferindo estatisticamente não apenas do controle negativo, mas também dos demais isolados, sendo considerados os mais eficazes no controle da mancha bacteriana do tomateiro (Tabela 3).

Corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, Chandrasekaran & Chun (2016b) verificaram a redução de 55% na severidade da mancha bacteriana do tomateiro, em plantas tratadas com o endófito *B. subtilis* CBR05. Nawangsih *et al.* (2011) estudaram dois isolados de bactérias endofíticas para biocontrole da murcha bacteriana do tomateiro, em que os isolados BC4 e BL10 reduziram a severidade da doença em 33% e 43%, respectivamente.

Nos ensaios conduzidos por Purnawati *et al.* (2014), dois isolados endofíticos foram capazes de reduzir a severidade da murcha bacteriana do tomateiro em condições de casa de vegetação. Mirik *et al.* (2008) relataram que o desenvolvimento de mancha da folha, causada por *X. vesicatoria*, foi reduzida em 11-62% em plantas de pimenta inoculadas com três linhagens de *Bacillus*, em casa de vegetação. Em campo, a redução da severidade dessa doença foi de 38 – 67% em plantas de pimenta inoculadas com *Bacillus*.

Comparando o número de isolados que apresentaram antagonismo *in vitro* e controle da severidade da mancha bacteriana *in planta*, nota-se que três isolados foram eficazes para os dois parâmetros avaliados (Ufla - 22, 51 e 47) (Tabela 3). Para o sucesso do controle biológico, apenas a antibiose *in vitro* não eleva o microrganismo ao “*status*” de bom bioagente, pois apenas o antagonismo, não garante o controle eficiente da doença *in planta*. Contudo, quando o microrganismo apresenta potencial antagônico e indutor de resistência, ele pode apresentar vantagens adicionais sobre aqueles que se destacaram unicamente em casa de vegetação ou *in vitro*, como os isolados Ufla – 22, 51 e 47, pois pode exercer tanto a antibiose quanto a indução de resistência em plantas de tomateiro. Esses fenômenos foram verificados com o teste de expressão gênica e com a atividade de enzimas de defesa.

Para isso, investigou-se o efeito indutor do isolado Ufla – 22, escolhido por ter apresentado o melhor resultado no controle da severidade da mancha bacteriana do tomateiro. Observou-se que esse tratamento foi capaz de induzir respostas de defesa no hospedeiro, pois esse isolado induziu ao aumento da transcrição do gene *SOD*, e proporcionou incrementos na atividade das enzimas PAL, POX, APX, CAT e SOD, em plantas de tomate posteriormente inoculadas com *X. vesicatoria*.

Após o reconhecimento do patógeno pela planta, a explosão oxidativa com geração de Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) é a primeira etapa de resposta de defesa da planta. As EAOs ocorrem normalmente no metabolismo celular, mas quando acumuladas, tornam-se tóxicas às células. Isso geralmente ocorre em plantas sob estresse, que acabam usando um complexo sistema de defesa antioxidante composto por antioxidantes não enzimáticos e enzimas de defesa, como a SOD, CAT, POX, glutatona redutase e APX, que são usadas para limpar as EAOs e proteger as células de danos oxidativos (Hossain & Uddin, 2011; Monteiro *et al.*, 2016).

Nesse trabalho, observou-se que o tratamento com o isolado endofítico Ufla – 22 possui eliciadores que possivelmente disparam respostas de defesa, pois esse tratamento induziu as plantas de tomateiro a apresentarem maiores níveis na atividade das enzimas relacionadas à limpeza de radicais livres (POX, APX, CAT e SOD). Essa atividade ocorreu



geralmente às 8 hai com *X. vesicatoria*, sugerindo que a presença da bactéria endofítica desencadeia a atividade de enzimas antioxidantes e diminui o acúmulo de EAOs, logo no início do processo de infecção pelo patógeno. Chandrasekaran & Chun (2016b) verificaram um aumento significativo nas atividades da SOD, CAT, POX e PPO (polifenol oxidase) em plantas de tomate tratadas com *B. subtilis*, 24 h após a inoculação, em comparação com controles não inoculados e controles inoculados com *X. vesicatoria*.

Li *et al.* (2015), utilizando a bactéria *B. amyloliquefaciens* LJ02, para controle de oídio em cucurbitáceas, verificaram o aumento nos níveis da atividade da POX, PPO, PAL e principalmente da SOD. Isso porque a SOD é uma enzima defensiva chave com a função de eliminar o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O aumento da atividade dessa enzima faz com que ocorra o acúmulo de  $H_2O_2$ , porém, o  $H_2O_2$  produzido como resultado da elevação nos níveis da SOD é convertido em água e oxigênio, em decorrência da atividade da CAT e POX (Chandrasekaran & Chun, 2016b).

Segundo Lanna Filho *et al.* (2013b), a aplicação foliar de espécies endofíticas de *Bacillus* induziu o aumento nos níveis de POX e PPO, resultando na redução da severidade da mancha bacteriana em tomateiro. Resultados semelhantes foram obtidos por Rajendran *et al.* (2006), em plantas de algodoeiro inoculadas com as endofíticas *Bacillus* e *Pseudomonas*, as quais induziram a expressão de POX e PPO e reduziram a severidade do crestamento bacteriano, causado por *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. Os resultados obtidos por esses autores apóiam os alcançados no presente trabalho, em que a atividade da POX atingiu altos níveis às 8 hai, no tratamento com o isolado Ufla – 22 e inoculado com *X. vesicatoria*, não havendo atividade da enzima nos demais tempos, tanto em plantas controle inoculadas quanto em plantas controle não inoculadas. Isso pode ser explicado porque níveis mais elevados na atividade da POX, induzida por espécies bacterianas, protegem as plantas contra a infecção de patógenos, e podem estar correlacionados com indução de resistência sistêmica, sendo o aumento da peroxidase, um dos marcadores de resistência induzida (Cavalcanti *et al.* 2006; Vanitha & Umesha, 2011; Li *et al.*, 2015).

A atividade da APX se manteve alta entre 8 e 16 hai com o patógeno, nas plantas que receberam o tratamento com o isolado Ufla – 22. A APX é uma das enzimas que removem o excesso de  $H_2O_2$ , reduzindo essa molécula à água e oxigênio, utilizando o ascorbato como agente redutor (Tang *et al.*, 2006). Isso sugere que o aumento significativo da atividade dessa enzima nos tempos supramencionados foi em função da remoção do excesso de  $H_2O_2$  das células da planta.

A PAL é uma enzima chave no metabolismo dos fenilpropanóides, que resultará em compostos como fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, conferindo maior resistência à parede celular das plantas (Raes *et al.*, 2003). Nesse estudo, a atividade da PAL foi elevada às 8 hai com *X. vesicatoria* somente em plantas que receberam como tratamento o isolado Ufla – 22. Ferraz *et al.* (2015) investigaram a eficiência dos antagonistas *Streptomyces setonii* (UFV618), *Bacillus cereus* (UFV592) e *Serratia marcescens* (UFV252) como potenciais indutores de resistência em tomateiro contra a mancha bacteriana, em que a atividade da PAL aumentou 1,4 vezes quando utilizado *Streptomyces setonii* aos 5 dai, em comparação com o controle. Kurth *et al.* (2014) observaram que a atividade da PAL aumentou em folhas de carvalho pedunculadas após a inoculação com *Microsphaera alphitoides* e *Streptomyces* sp. estirpe AcH 505, sendo o aumento na atividade dessa enzima ainda mais significativa quando feita a co-inoculação com o fungo e a bactéria.

O estudo da expressão do gene de defesa *SOD*, por meio da técnica RT – qPCR, demonstrou que plantas que receberam o tratamento com a bactéria endofítica Ufla – 22, seguido de inoculação com *X. vesicatoria*, apresentaram maior expressão deste, às 8 hai. O aumento na transcrição do gene *SOD* serve como indicador que a rota de defesa do estresse oxidativo foi ativada pela bactéria endofítica Ufla -22, após desafio com o patógeno. Foi observado também, que quando a bactéria endofítica não está presente na interação, não ocorre a expressão desse gene de defesa. É importante destacar que o resultado obtido com a técnica de RT-qPCR foi semelhante aos obtidos na atividade enzimática da enzima *SOD*, comprovando que o gene transcrito foi traduzido em proteína.

Gond *et al.* (2015) também verificaram a capacidade de bactérias endofíticas em induzir a expressão de genes de defesa para evitar a colonização por *Fusarium moniliforme* em milho. Esses autores verificaram uma ligeira expressão do gene *SOD* em plantas tratadas com as bactérias endofíticas. Uma possível explicação para esse fenômeno é que, a rapidez nas mudanças transcricionais após a inoculação pode estar diretamente relacionada com o reconhecimento de padrões moleculares ligados ao patógeno, devido à ativação dos mecanismos iniciais de percepção e transdução de sinais após a inoculação, que faz com que proteínas receptoras das células da planta induzam a expressão de genes e compostos de defesa (Guzzo, 2004).

Dessa forma, o controle biológico pode ser uma estratégia viável para culturas que não têm defensivos químicos registrados ou para os quais, os produtos registrados não são eficientes (Shanmugam & Kanoujia, 2011; Ferraz *et al.*, 2014 ). A utilização de resistência induzida por bactérias não patogênicas e indutores abióticos para controle de doenças em

culturas agronômicas tem aumentado nos últimos anos (Van Loon, 2007; Nafie *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2014). Nesse contexto, o uso de agentes de biocontrole integrados às práticas convencionais de manejo, podem ser mais eficientes no controle da mancha bacteriana do tomateiro, reduzindo os custos de produção para o produtor rural.

Com o presente estudo, foi possível comprovar que o isolado endofítico Ufla – 22 proporcionou o controle de *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por meio da antibiose e também por indução de resistência sistêmica.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiar esse estudo, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Fisiologia do Parasitismo, Virologia Molecular e Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA pelo suporte na execução dos experimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarenga MAR (2013) **Tomate: Produção em Campo, Casa de Vegetação e Hidroponia**. Lavras: UFLA, 455p.

Anderson D, Prasad K, Stewart R (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology** 109:1247-1257.

Aquino RFBA, Costa RIF, Aquino LA, Sá LP (2011) Dinâmica populacional de pragas em tomateiro industrial no norte de Minas Gerais. **Evolução e Conservação da Biodiversidade** 2:47-51.

Barretti PB, Romeiro RS, Mizubuti ESG, Souza JT (2009) Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia** 33:2038-2044.

Barretti PB, Souza RM, Pozza EA, Souza JT (2012) Combination of endophytic bacteria and resistant cultivars improves control of *Ralstonia* wilt of tomato. **Australasian Plant Pathology** 41:189–195.

Bashan Y, Okon Y, Henis Y (1982) Long term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology** 72:1143-1144.

Bettiol W, Ghini R (1995) Controle Biológico. In: Bergamin AF, Kimati H, Amorin L. **Manual de Fitopatologia**. Princípios e Conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.717-728.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248–254.

Byrne JM, Dianese AC, Ji P, Campbell HL, Cuppels DA, Louws FJ, Millerd SA, Jones JB, Wilson M (2005) Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biological Control** 32:408–418.

Cakmak L, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 83:463-468.

Campos Silva JR, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCP, Castro MAS (2008) Control with endophytic bacteria and in vitro inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agent of bacterial speck of tomato. **Ciência e Agrotecnologia** 32:1062-1072.

Cavalcanti FR, Resende MLV, Carvalho CPS, Silveira JAG, Oliveira JTA (2006) Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis perniciosa*. **Biological Control** 39:408–417.

Chance B, Maehley AC (1995) Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology** 1:764-775.

Chandrasekaran M, Chun SC (2016a) Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 80:2277–2283.

Chandrasekaran M, Chun SC (2016b) Induction of defense-related enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants treated with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Biocontrol Science and Technology** 26:1-21.

Clemente FMVT, Boiteux LS (2012) **Produção de tomate para processamento industrial**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa.

Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant & Cell Physiology** 34:1023-1028.

Ferraz HGM, Resende RS, Moreira PC, Silveira PR, Milagres EA, Oliveira JR, Rodrigues FÁ (2015) Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. **Bragantia** 74:417-427.

Ferraz HGM, Resende RS, Silveira PR, Andrade CCL, Milagres EA, Oliveira JR, Rodrigues FA (2014) Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia** 73:274-283.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042.

Fousia S, Paplomatas EJ, Tjamos SE (2015) *Bacillus subtilis* QST 713 confers protection to tomato plants against *Pseudomonas syringae* pv. tomato and induces plant defence-related genes. **Journal of Phytopathology** 164:264–270.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309–314.

Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research** 172:79–87.

Guzzo SD (2004) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba.

Hassan EO, Zyton MA(2017) Management of Bacterial Spot of Pepper Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **American Journal of Bioscience and Bioengineering** 5:41-49.

Hert AP, Marutani M, Momol T, Robert PD, Olson SM, Jones JB (2009) Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. **Applied and Environmental Microbiology** 75:3323–3330.

Hossain MA, Uddin SN (2011) Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science** 5:1094–1101.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57:315–319.

Kiraly Z, Klement z, Solymosy F, Voros J (1974) **Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance**. 509.

Klement Z (1964) Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. **Nature** 199:209-300.

Kurth F, Mailänder S, Bönn M, Feldhahn L, Herrmann S, Große I, Buscot F, Schrey SD, Tarkka MT (2014) *Streptomyces* induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 27:891-900.

Lanna Filho R, Souza RM, Ferreira A, Quecine MC, Alves E, Azevedo JL (2013a) Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. **Australasian Plant Pathology** 42:643–651.

Lanna Filho R, Souza RM, Magalhães MM, Villela L, Zanotto E, Ribeiro-Júnior PM, Resende MLV (2013b) Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. **Tropical Plant Pathology** 38:295-302.

Li SM, Hua GG, Liu HX, Guo JH (2008). Analysis of defence enzymes induced by an antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* AR12 towards *Ralstonia solanacearum* in tomato. **Annals of Microbiology** 58:573-578.

Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q, Wang Y (2015) Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. **Frontiers in Microbiology** 6:883.

Lin T, Zhao L, Yang Y, Guan Q, Gong M (2013) Potential of endophytic bacteria from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against *Verticillium* wilt disease. **Australian Journal of Crop Science** 7:139-146.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) method. **Methods** 25:402–408.

Lopes CA, Ávila AC (2005) **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 151 p.

Lopes CA, Quezado-Soares AM (1997) **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 70 p.

Luz JMQ, Shinzato AV, Silva MAD (2007) Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **Bioscience Journal** 23:7-15.

Mariano RLR (2000) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: [s.n.], 171p.

Martin H, Hamilton V, Kopittke R (2004) Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. **Plant disease** 88:921–924.

Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F (2010) Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology** 11:805–816.



Medeiros FHV, Souza RM, Medeiros FCL, Zhang H, Wheeler T, Payton P, Ferro HM, Paré PW (2011) Transcriptional profiling in cotton associated with *Bacillus subtilis* (UFLA285) induced biotic-stress tolerance. **Plant and Soil** 347:327-337.

Mirik M, Aysan Y, Cinar O (2008) Biological control of bacterial spot disease of pepper with *Bacillus* Strains. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 32: 381-390.

Monteiro ACA, Resende MLV, Valente TCT, Junior PMR, Pereira VF, Costa JR, Silva JAG (2016) Manganese phosphite in coffee defence against hemileia vastatrix, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology** 164:1043–1053.

Nafie E, Hathout T, Al Mokadem AS (2011) Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 23:161-174.

Nagendran K, Karthikeyan G, Peeran MF, Raveendran M, Prabakar K, Raguchander T (2013). Management of bacterial leaf blight disease in rice with endophytic bacteria. **World Applied Sciences Journal** 28:2229-2241.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology** 22:867–880.

Nascimento AR, Fernandes PM, Borges LC, Moita AW, Quezado-Duval AM (2013) Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira** 31:15-24.

Nawangsih AA, Damayanti I, Wiyono S, Kartika JG (2011) Selection and characterization of endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. **HAYATI Journal of Biosciences** 18:66-70.

Ongena M, Duby F, Jourdan E, Beaudry T, Jadin V, Dommes J, Thonart P (2005) *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology** 67:692-698.

Peretto AJ, Silva CL (2002) **Guia de avaliação de ensaios. Fitopatologia. Escalas diagramáticas e chaves descritivas.** Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento. Hokko do Brasil Indústria Química e Agropecuária Ltda. 50p.

Pinho RSC, Campos VP, Souza RM, Silva JRC, Oliveira MS, Pimentel GCS, Costa SAS (2009) Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira** 33:54-60.

Pozzebon BC, Santos J (2016) Bactérias endofíticas: passado, presente e perspectivas futuras visando um futuro sustentável. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 24:115-119.

Purnawati A, Sastrahidayat IR, Abadi AL, Hadiastono T (2014) Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. **The Journal Of Tropical Life Science** 4:33-36.

Pusey PL, Stockwell VO, Mazzola M (2009) Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology** 99:571-581.

Quezado-Duval AM, Lopes CA (2010) **Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria.** Circular Técnica. Brasília: 24 p.

Raddadi N, Belaouis A, Tamagnini I, Hansen BM, Hendriksen NB, Boudabous A, Cherif A, Daffonchio D (2009). Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. **Journal of Basic Microbiology** 49:293–303.

Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 133:1051-1071.

Rajendran L, Saravanakumar D, Raguchander T, Samiyappan R (2006) Endophytic bacterial induction of defence enzymes against bacterial blight of cotton. **Phytopathologia Mediterranea** 45:203–214.

Romeiro RS (2001) **Métodos em bacteriologia de plantas**, 1st ed. 279.

Romeiro RS, Lanna Filho R, Macagnan D, Garcia FAO, Silva HSA (2010) Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology** 35:11- 15.

Romeiro RS, Lanna Filho R, Vieira Junior JR, Silva HAS, Baracat-Pereira MC, Carvalho MG (2005) Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal Phytopathology** 153:120-123.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters** 278:1-9.

Santos TT, Varavallo MA (2011) Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde** 32:199-212.

Souza RD, Mendonça EAF, Soares MA (2015) Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica** 41:229-232.

Shanmugam V, Kanoujia N (2011) Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. **Biological Control** 57:85-93.

Soares MAS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas** 1:9-19.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology** 56:845-857.

Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2006) Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. **Plant Cell Reports** 25:1380-1386.

Tuite J (1969) **Plant Pathological Methods**. 239p.

Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology** 119:243-254.

Vanitha SC, Umesha S (2011) *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance in tomato is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. **Biologia Plantarum** 55:317–322.

Vidaver AK, Mathys ML, Thomas ME, Schuster ML (1972) Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology** 18:705-713.

Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. **Nature reviews. Microbiology** 10:828–840.

Wang X, Wang L, Wang J, Jin P, Liu H (2014) *Bacillus cereus* AR156- Induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in Loquat fruit. **PLoS ONE** 9:112494.

Wilson M, Campbell HL, Ji P, Jones JB, Cuppels DA (2002) Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. **Phytopathology** 92:1284–1292.

Yadav DK, Singh D, Kumar N (2017) Induction of defense-related enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* DSBA-11 in resistant and susceptible cultivars of tomato against bacterial wilt disease. *International Journal of Agricultural Research* 12:172-180.

Zucker M (1965) Induction of phenylalanine de aminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology** 40:779-784.

**ARTIGO 2 Bactérias endofíticas no manejo da pinta bacteriana do tomateiro:  
Análises bioquímicas e moleculares.**

<sup>1</sup>Bruna Canabarro Pozzebon et al.

Artigo formatado de acordo com as normas de Journal of Phytopathology  
(Versão preliminar)

---

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Autor para correspondência: Ricardo Magela de Souza, e-mail: [rmagelas@dfp.ufla.br](mailto:rmagelas@dfp.ufla.br).

**RESUMO**

A pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) pode causar perdas de até 75% quando ocorre no início do cultivo. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar o potencial de biocontrole e indução de resistência de bactérias endofíticas, contra a pinta bacteriana do tomateiro, através de análises bioquímicas e moleculares. Para isso, foram realizados testes de antagonismo *in vitro*, avaliação da severidade da doença em casa de vegetação, e estudo de mecanismos de indução de resistência, através da expressão do gene de defesa *SOD*, gene de patogenicidade *hrpL* de *P. syringae* pv. *tomato*, e atividade de enzimas de defesa da rota dos fenilpropanóides (PAL e POX) e estresse oxidativo (SOD, APX e CAT). Os isolados Ufla – 22, 285 e 20 apresentaram os maiores halos de inibição frente à bactéria fitopatogênica *in vitro*. Em casa de vegetação, oito isolados reduziram a severidade da pinta bacteriana, sendo o isolado Ufla - 285 o mais eficaz, reduzindo em 56% a severidade da doença. Este isolado apresentou um bom efeito antagônico e, por isso, foi selecionado para as análises molecular e enzimática. Observou-se que o isolado Ufla – 285 possui efeito indutor de resistência, pois induziu o aumento da transcrição do gene de defesa *SOD* e proporcionou incremento na atividade das enzimas de defesa PAL, POX, SOD, APX e CAT, em plantas de tomate inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato*. Além disso, quando avaliou-se a expressão do gene de patogenicidade *hrpL*, o mesmo foi expresso substancialmente quando o isolado Ufla – 285 não estava presente na interação. Dessa forma, sugere-se que o uso de bactérias endofíticas como agentes de controle biológico pode ser uma alternativa eficiente para o manejo da pinta bacteriana, pois desempenham papel fundamental na indução de resistência sistêmica do tomateiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, indução de resistência, controle biológico.

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças do tomateiro, a pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978 (*Pst*) é uma das mais severas. A doença pode acarretar perdas de até 75% na produtividade, quando ocorre em plantas jovens e sob condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, devido à redução do tecido foliar e área fotossintetizante da planta e pela queda prematura de frutos (Yunis et al. 1980; Campos Silva et al. 2008; Lanna Filho et al. 2013). Além disso, o progresso da doença é favorecido por longos períodos de molhamento foliar, temperaturas amenas (15 – 25 °C) e práticas culturais que permitam a disseminação de bactérias entre plantas hospedeiras (Preston, 2000; Mioranza et al. 2014).

O controle de doenças de etiologia bacteriana é difícil, com limitações quanto à disponibilidade e eficiência de produtos químicos (Campos-Silva et al. 2008). Um dos principais fatores limitantes, nesse caso, é a toxicidade dos mesmos ao meio ambiente e a pouca efetividade em condições ótimas ao desenvolvimento da doença (Hert et al. 2009; Clemente e Boiteux, 2012). No caso específico da pinta bacteriana, a recomendação tem sido o uso de cultivares resistentes que possuem o gene *Pto* (Clemente e Boiteux, 2012; Andrade et al. 2013). Em contrapartida, a busca por métodos de controle que apresentem a redução do uso de produtos químicos, a conscientização da população sobre questões ambientais e a redução dos custos de produção, vem se destacando e gerando medidas de segurança alimentar, sustentabilidade e economia no manejo fitossanitário (Andrade et al. 2013).

Nesse contexto, o controle biológico de doenças é uma linha de pesquisa que vem crescendo, justamente por ser um método natural, que não apresenta impactos e nem efeitos toxicológicos ao homem e ao meio ambiente (Campos Silva et al. 2008). O uso de bactérias endofíticas como agentes de controle pode ser uma medida eficaz no manejo de manchas foliares, pois são microrganismos que atuam no mesmo habitat de muitas bactérias fitopatogênicas (Barra et al. 2008; Ryan et al. 2008).

O controle de fitobacterioses por esses microrganismos pode ocorrer diretamente, pela produção e liberação de compostos bactericidas, como por exemplo, as surfactinas, que são eliciadores de resistência (Arguelles-Arias et al. 2009; Weyens et al. 2009). Da mesma forma, a capacidade de ativação de mecanismos de proteção contra fitopatógenos, como a indução de resistência sistêmica (ISR), são mecanismos de controle biológico altamente eficientes, desencadeados por esses microrganismos (Silva et al. 2004; Van Loon, 2007). Com isso, objetivou-se com esse trabalho, avaliar o potencial de biocontrole e indução de resistência de

bactérias endofíticas, contra a pinta bacteriana do tomateiro, através de análises bioquímicas e moleculares.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Origem dos microrganismos endofíticos e patogênicos

Os isolados endofíticos e de *P. syringae* pv. *tomato* foram obtidos da coleção de isolados bacterianos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Para a realização desse estudo, foram escolhidos 15 isolados endofíticos, que apresentaram potencial de biocontrole em estudos preliminares (Tabela 1).

TABELA 1. Bactérias endofíticas utilizadas como potenciais agentes de controle biológico da pinta bacteriana do tomateiro.

Isolado (bactéria endofítica)	Origem:/ Ano
<i>Paenibacillus macerans</i> (Ufla - 37 e 47)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 50)	Campos Silva et al. (2008)/ Lanna Filho et al. (2013)
<i>Bacillus pumillus</i> (Ufla - 2, 12, 20, 39 e 51)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus sphaericus</i> (Ufla - 45)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus</i> sp. (Ufla - 24)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus pumillus</i> (Ufla - 6)	Campos Silva et al. (2008)/ Lanna Filho et al. (2013)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 22)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus megaterium</i> (Ufla - 7)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Paenibacillus gordonae</i> (Ufla - 40)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 285)	Medeiros et al. (2011)

### 2.2 Antagonismo *in vitro*

O teste de antibiose foi realizado através do método da dupla camada de meio de cultura em placas de Petri. Para isso, uma camada básica de aproximadamente 6 mL de meio de cultura sólido 523, de Kado e Heskett (1970), foi formada nas placas de Petri. As 15



bactérias endofíticas foram cultivadas em meio 523 líquido, e agitadas em Shaker durante 12 h, a 38 rpm e 28 °C. Posteriormente, 0,5 µL de suspensão dos isolados foram semeados em pontos equidistantes na placa, de maneira que cada placa de Petri contemplasse três isolados endofíticos e o tratamento controle (água destilada e esterilizada). As placas foram incubadas por 12 h, a 28 °C, tempo suficiente para as colônias apresentarem crescimento evidente.

Após o crescimento, as colônias foram mortas pela exposição a vapores de clorofórmio durante uma hora, seguido de exposição direta à luz ultravioleta (UV) por mais uma hora. Em seguida, as placas contendo colônias inativadas de isolados endofíticos, receberam uma sobre-camada de meio de cultura 523 semi-sólido fundente (45 °C, contendo ágar 0,8%), ao qual foram incorporados 100 µL de suspensão com *Pst*. Após a solidificação da sobre-camada de meio, as placas foram incubadas a 28 °C, por 48 h, e a seguir, avaliadas quanto à inibição ou não do crescimento da bactéria fitopatogênica (Vidaver et al. 1972).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições para cada isolado endofítico. Havendo halo de inibição, o mesmo foi mensurado em centímetros. Os dados foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011), submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo teste *F*, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ). Esse experimento foi realizado duas vezes.

## **2.3 Proteção de plantas de tomateiro contra a mancha bacteriana**

### **2.3.1 Bacterização das sementes com os isolados endofíticos e obtenção das mudas de tomateiro**

Os isolados endofíticos foram introduzidos via tratatamento de sementes. Para isso, sementes de tomate da cultivar suscetível Santa Clara foram desinfestadas superficialmente, pelo do método da tríplice lavagem (1 minuto em álcool 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio 2% e três lavagens em água destilada e esterilizada) (Pinho et al. 2009). Posteriormente, aproximadamente 0,3 g de sementes desinfestadas e secas foram adicionadas em copos plásticos de 20 mL. Culturas bacterianas endofíticas com crescimento de 24 h, foram postas em suspensão, através da adição de solução salina de NaCl 0,85% às colônias, e posterior raspagem, com alça de Drigalski, até a obtenção de uma suspensão homogênea de células bacterianas, ajustadas em espectrofotômetro para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho et al. 2009). Essa suspensão de células foi adicionada aos copos plásticos, de maneira a cobrir

completamente as sementes. Como controle negativo utilizou-se sementes imersas em solução salina de NaCl 0,85%. Os copos plásticos foram acomodados em Shaker e agitados por 24 h, a 38 rpm e 28 °C. Após a bacterização, foi realizada a semeadura das sementes em bandejas de poliestireno expandido, contendo mistura de solo, esterco e areia, na proporção 1:1:1 (v/v/v) e cultivadas em casa de vegetação com temperatura e umidade parcialmente controladas ( $\pm 25$  °C e UR = 80%). Quando as plântulas apresentaram duas folhas verdadeiras, foi realizado o transplântio, mantendo uma planta por vaso.

### 2.3.2 Preparo do inóculo e inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

O preparo do inóculo constou do crescimento prévio de *Pst* em meio de cultura 523 por 48 h, a 28 °C, e preparo das suspensões bacterianas em solução salina (NaCl 0,85%), ajustadas para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho et al. 2009). Aproximadamente 5 mL de suspensão de *Pst* foram atomizadas sobre plantas de tomate apresentando quatro folhas verdadeiras, mantidas em câmara úmida, 24 h antes e após a inoculação.

Foram realizadas cinco avaliações da severidade da doença a partir do surgimento dos primeiros sintomas, em quatro folhas verdadeiras de cada planta de tomate, previamente etiquetadas para manter o mesmo padrão de avaliação. As avaliações foram feitas em intervalos de quatro dias entre uma e outra, utilizando-se a escala diagramática proposta por Peretto e Silva (2002).

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), com três repetições, sendo cada parcela experimental composta por duas plantas. Para comparar as bactérias endofíticas quanto à redução da severidade da doença nas plantas, realizou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), utilizando-se a fórmula:

$$AACPSD = \sum_{i=0}^{n-1} (Y_i + Y_{i+1})/2 * (T_{i+1} - T_i),$$

Onde:

n é o número de avaliações; Y a severidade da doença; T o tempo quando da avaliação da doença;  $(Y_i + Y_{i+1})$  a altura média do retângulo entre os pontos  $Y_i$  e  $Y_{i+1}$ ; e  $T_{i+1} - T_i$  a diferença da base do retângulo entre os pontos  $T_{i+1}$  e  $T_i$ .

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011), em que os valores de AACPSD de cada bactéria endofítica, foram

submetidos ao teste  $F$  na análise de variância e as médias, quando significativas, agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

Foi estimada também a taxa de progresso da doença ( $r$ ), determinada pelo parâmetro  $b$  da equação de regressão ( $p \leq 0.01$ ). As análises de regressão foram realizadas utilizando o *software* Excel. Esse experimento foi realizado duas vezes.

## **2.4 Análises moleculares e bioquímicas da resposta de defesa induzida por bactérias endofíticas em tomateiro contra a pinta bacteriana**

### **2.4.1 Preparo das plantas e inoculação**

O tratamento Ufla – 285 (*B. amyloliquefaciens*) foi selecionado para a realização desse experimento por ser o mais eficaz na redução da severidade da pinta bacteriana em casa de vegetação. A verificação do seu efeito indutor ocorreu mediante análise de expressão do gene de defesa *SOD*, expressão do gene de patogenicidade *hrpL* de *P. syringae* pv. *tomato*, e atividade de enzimas de defesa da planta. Para esse ensaio, foram utilizados três tratamentos: T1) Ufla - 285 + *Pst*; T2) *Pst*; T3) Sem inoculação.

O isolado Ufla - 285 foi crescido em meio 523 por 24 h, a 28 °C, e, posto em suspensão, ajustada para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc  $mL^{-1}$ ) (Pinho et al. 2009). Como controle negativo, as sementes foram imersas em solução salina de NaCl 0,85%. Posteriormente, procedeu-se a bacterização das sementes Shaker, por 24 h, com agitação constante a 38 rpm e 28 °C. Após a bacterização, as sementes foram semeadas em vasos de 3 L, contendo mistura de solo, esterco e areia, na proporção 1:1:1 (v/v/v), previamente autoclavados.

Ao apresentarem quatro folhas verdadeiras, as plantas referentes aos tratamentos T1 e T2 foram inoculadas por aspersão com aproximadamente 5 mL de suspensão de *Pst*,  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc  $mL^{-1}$ ) (Pinho et al. 2009), e mantidas em câmara úmida 24 h antes e após a inoculação. Amostras de folhas de tomateiro de cada um dos três tratamentos foram coletadas às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação (hai) com a fitobactéria.

As folhas coletadas foram armazenadas em sacos plásticos previamente identificados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido, e em seguida, as amostras destinadas a análise da expressão gênica e atividade enzimática foram armazenadas em temperatura de -20 °C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), com três repetições e três plantas para cada tempo de coleta.

## 2.4.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Aproximadamente 0,24 g de cada amostra coletada foi macerada em nitrogênio líquido, e utilizadas para extração do RNA total pelo método *TRIzol RNA Isolation*, seguindo o protocolo para tecidos de plantas ([http://afgc.stanford.edu/afgc\\_html/site2Rna.htm#isolation](http://afgc.stanford.edu/afgc_html/site2Rna.htm#isolation)). A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed™, e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™ Plus Spectrophotometer. Para assegurar a qualidade e apenas a presença de RNA, as amostras foram tratadas com DNASE, com o *Kit TURBO DNA-free™* (Invitrogen), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante, e novamente quantificadas. Para a síntese de cDNA, utilizou-se o Kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram mantidas em temperatura de -20 °C até o uso.

Os *primers* para análise da expressão de genes de defesa da planta utilizados nesse estudo foram: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - GAPDH* F: 5'-ACCACAAATTGCCTTGCTCCCTTG-3'; *GAPDH* R: 5'-ATCAACGGTCTTCTGAGTGGCTGT-3', utilizado como gene de referencia na normalização da expressão gênica em tomateiro; e *Superóxido dismutase - SOD* F: 5'-CTGGGAATCTATGAAGCCCAACGGA-3'; *SOD* R: 5'-CAAATTGTGTTGCTGCAGCTGCCTT-3', utilizado como gene de defesa expresso na rota de estresse oxidativo da planta, desenhados por Mascia et al. (2010).

Os *primers* utilizados na expressão de genes de patogenicidade foram: 16S F: 5'-CAGCTCGTGTCGTGAGATGT-3'; 16S R: 5'-CACCGGCAGTCTCCTTAGAG-3', utilizado como gene de referência na normalização da expressão gênica em *P. syringae* pv. *tomato*; e *hrpL* F: 5'-CTCCAGTGCGTGTTTCTTGA-3'; *hrpL* R: 5'-AGCTTTCCTGATACGGCTGA-3', como gene de patogenicidade (Lee et al. 2015).

Para análise da RT-qPCR, utilizou-se o modelo ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems), e o sistema de detecção foi o *SYBR Green*. Para cada reação foi utilizado 0,5 µL de cDNA, 0,2 µL de cada *primer* a 10 µM e 2,5 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), para um volume final de amostra de 5 µL. A amplificação foi conduzida em incubações iniciais por 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A curva de *melting*

foi determinada após o término dos ciclos de reações de cada produto amplificado entre 72 e 95 °C.

Para cada gene em estudo, o experimento foi conduzido a partir de cDNAs obtidos de três repetições biológicas, com três replicatas técnicas, sendo os resultados normalizados, usando os CTs (Ciclo *Threshold*), obtidos pela expressão do gene constitutivo de cada análise. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método CT comparativo (Livak e Schmittgen, 2001).

### 2.4.3 Análise da atividade de enzimas de defesa da planta

A obtenção dos extratos enzimáticos usados na determinação da atividade das enzimas de defesa PAL (Fenilalanina amônia-liases) e POX (Peroxidase) constou da maceração de amostras do tecido foliar em nitrogênio líquido, em almofariz, até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF), na proporção de 1,0 mL de tampão para 0,2 g de pó obtido, que foi posteriormente centrifugado a 14.000 rpm por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade da PAL iniciou-se após a adição de 10 µL do extrato enzimático a uma mistura de 140 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 50 µL de L-fenilalanina 50 mM. A mistura da reação foi incubada a 37°C durante 20 minutos, e posteriormente, a absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 280 nm. O coeficiente de extinção molar de 10.000 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Zucker, 1965), foi utilizado para calcular a atividade da PAL, que foi expressa em µM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para a atividade da POX, determinou-se a oxidação do guaiacol, de acordo com a metodologia de Kar & Mishra (1976). Para isso, foram adicionados 5 µL do extrato enzimático à mistura contendo 115 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 40 µL de guaiacol 50 mM e 40 µL de peróxido de hidrogênio 125 mM. Essa mistura foi incubada a 30 °C por 10 minutos, e posteriormente, a absorbância foi medida a 480 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para calcular a atividade da POX (Chance & Maehley, 1955), a qual foi expressa em mM de tetraguaiacol produzido por min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A obtenção dos extratos enzimáticos usados na determinação da atividade da APX (Ascorbato peroxidase), CAT (Catalase) e SOD (Superóxido dismutase), constou de amostras de tecido foliar maceradas em nitrogênio líquido em almofariz, até a obtenção de um pó fino.

Esse pó foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), contendo 10 mM de EDTA, 200 mM de ácido ascórbico e água, na proporção de 1,0 mL de tampão para 0,2 g de pó obtido. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante obtido, utilizado para as determinações enzimáticas.

Determinou-se a atividade da APX pelo método de Nakano & Asada (1981), em que 10 µL do extrato enzimático foram adicionados a uma solução contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10 µL de ácido ascórbico 10 mM, 10 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 70 µL de água. A atividade enzimática foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 3 min a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, foi utilizado para calcular a atividade da APX, expressa em mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Cakmak & Horst (1991), mediante avaliação do decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos a 25 °C. Para isso, foram adicionados 10 µL de extrato enzimático, contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 80 µL de água e 10 µL de peróxido de hidrogênio 250 mM. A atividade enzimática foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm durante 3 min a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al., 1995) foi utilizado para determinar a atividade da CAT, expressa em mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Avaliou-se a atividade da SOD através da capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977), em meio de incubação contendo por 30 µL do extrato foliar, contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 40 µL de metionina 70 mM, 15 µL de azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 1 mM, 2 µL de EDTA 10 mM, 2 µL de riboflavina 0,2 mM e 11 µL de água (Del Longo et al., 1993). Procedeu-se uma incubação por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 15 W, e realizou-se a leitura da placa a 560 nm. Uma unidade da SOD correspondeu à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A proteína total de cada extrato enzimático foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados da atividade das enzimas PAL, POX, APX, CAT e SOD foram submetidos à análise de variância, e quando significativas pelo teste *F*, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

### 3 RESULTADOS

Nove isolados endofíticos apresentaram efeito antagônico significativo sobre o crescimento *in vitro* de *P. syringae* pv. *tomato* (Tabela 2). Destes, os isolados Ufla - 22, 285 e 20 (Figura 1A e 1B) foram os que apresentaram a maior atividade inibitória ao patógeno desafiante, com halos de inibição de 1,22, 1,14 e 0,96 cm, respectivamente, quando comparados com o tratamento controle (água destilada e esterilizada).

TABELA 2. Atividade antagônica de bactérias endofíticas ao crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

<b>Antibiose <i>In vitro</i></b>	
<b>Isolado Ufla -</b>	<b>Média do Halo de Inibição (cm)</b>
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 22	1.22 a*
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 285	1.14 a
<i>B. pumillus</i> - 20	0.96 a
<i>B. pumillus</i> - 51	0.72 b
<i>P. gordonae</i> - 40	0.66 b
<i>P. macerans</i> - 37	0.60 b
<i>B. pumillus</i> - 12	0.58 b
<i>Bacillus sp</i> - 24	0.58 b
<i>P. macerans</i> - 47	0.44 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 50	0.24 c
Controle	0,00 c
<i>B. pumillus</i> - 6	0,00 c
<i>B. pumillus</i> - 39	0,00 c
<i>B. megaterium</i> - 7	0,00 c
<i>B. pumillus</i> - 2	0,00 c
45	0,00 c
<b>CV(%)</b>	<b>29,89</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

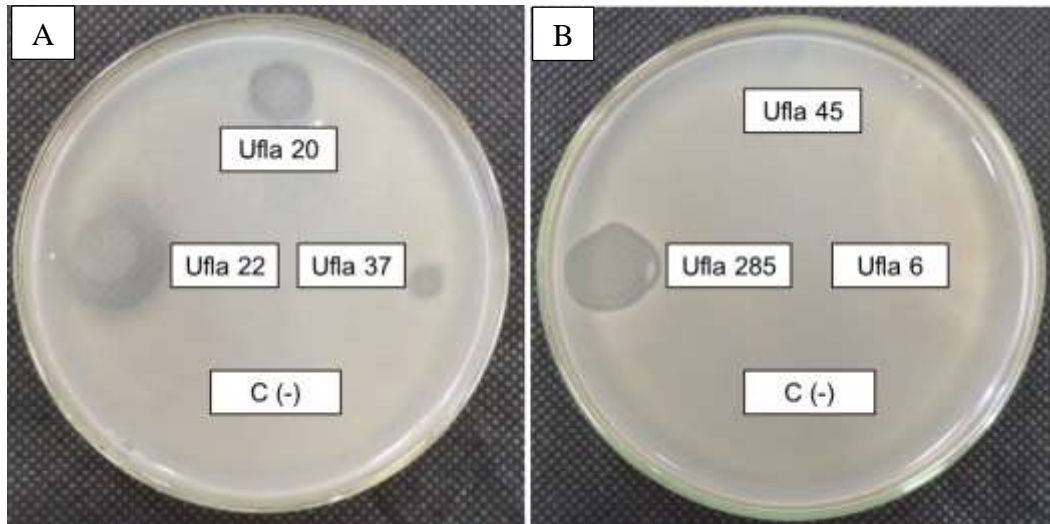


FIGURA 1. (A) Inibição do crescimento *in vitro* de *P. syringae* pv. *tomato*, pelos isolados endofíticos Ufla - 20, 22 e 37, comparados ao tratamento controle (C (-)); (B) Inibição do crescimento *in vitro* de *P. syringae* pv. *tomato* pelo isolado Ufla - 285, e isolados Ufla - 6, 45, e tratamento controle (C(-)), sem potencial de antagonismo.

Os isolados Ufla - 285, 12, 24, 40, 6, 39, 7 e 2 diferiram estatisticamente dos demais tratamentos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação, reduzindo a severidade da doença em 56%, 52%, 48%, 47%, 45%, 44%, 43% e 39%, respectivamente, quando comparados ao controle (100% de doença) (Tabela 3 e Figura 2). Desses, quatro isolados (Ufla - 285, 12, 24 e 40) apresentaram também potencial de antagonismo *in vitro* (Tabela 3).



TABELA 3. Isolados endofíticos na severidade da pinta bacteriana em folhas de tomateiro em casa de vegetação (Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade da Doença - AACPSD), taxa de progresso da doença no tempo e inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Isolado Ufla -	AACPSD	Taxa de progresso da doença	Halo de inibição
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 285	108,42 a*	0,833**	+
<i>B. pumillus</i> - 12	118,16 a	1,026	+
<i>Bacillus</i> sp. - 24	126,89 a	1,180	+
<i>P. gordonae</i> - 40	129,19 a	1,013	+
<i>B. pumillus</i> - 6	135,98 a	0,912	-
<i>B. pumillus</i> - 39	138,31 a	0,967	-
<i>B. megaterium</i> - 7	138,56 a	0,910	-
<i>B. pumillus</i> - 2	149,31 a	1,016	-
<i>B. pumillus</i> - 51	173,03 b	1,249	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 22	183,10 b	1,348	+
<i>P. macerans</i> - 47	198,68 b	1,435	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 50	199,23 b	1,403	+
<i>P. macerans</i> - 37	201,19 b	1,462	+
<i>B. sphaericus</i> - 45	212,13 b	1,252	-
<i>B. pumillus</i> - 20	216,15 b	1,285	+
Controle	245,07 b	1,721	-
<b>CV (%)</b>	<b>15,30</b>		

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

\*\* Significância na análise de regressão  $p \leq 0,01$ .

(+) = Presença de halo de inibição (-) = Ausência de halo de inibição.

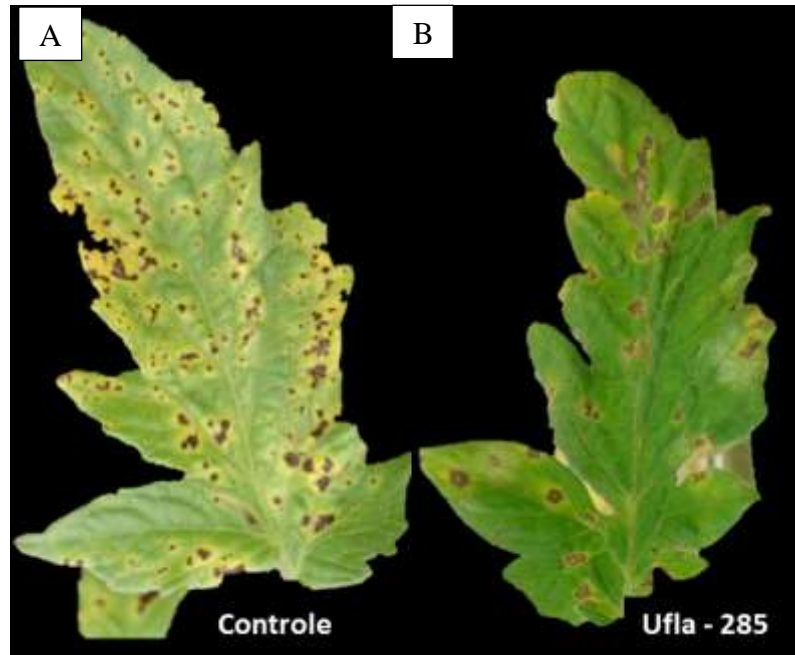


FIGURA 2. Severidade da pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, em folhas de tomate cultivado em casa de vegetação, oriundas de sementes bacterizadas com Solução salina de NaCl 0,85% (A) e bacterizadas com o isolado endofítico Ufla – 285 (B).

Houve aumento na expressão do gene de defesa *SOD* nas plantas de tomate bacterizadas com a bactéria endofítica Ufla – 285, seguida de inoculação com *P. syringae* pv. *tomato* (T1), às 8 e 16 hai, em relação às plantas controle não inoculadas (T3) e inoculadas apenas com a bactéria fitopatogênica (T2) (Figura 3A).

Na análise dos transcritos do gene de patogenicidade *hrpL* de *P. syringae* pv. *tomato*, verificou-se que houve o aumento da expressão do mesmo, às 24 hai, na ausência da bactéria endofítica Ufla – 285. Já na presença da bactéria endofítica Ufla - 285, houve uma menor expressão do gene *hrpL*, quando comparado com plantas inoculadas apenas com *Pst*.

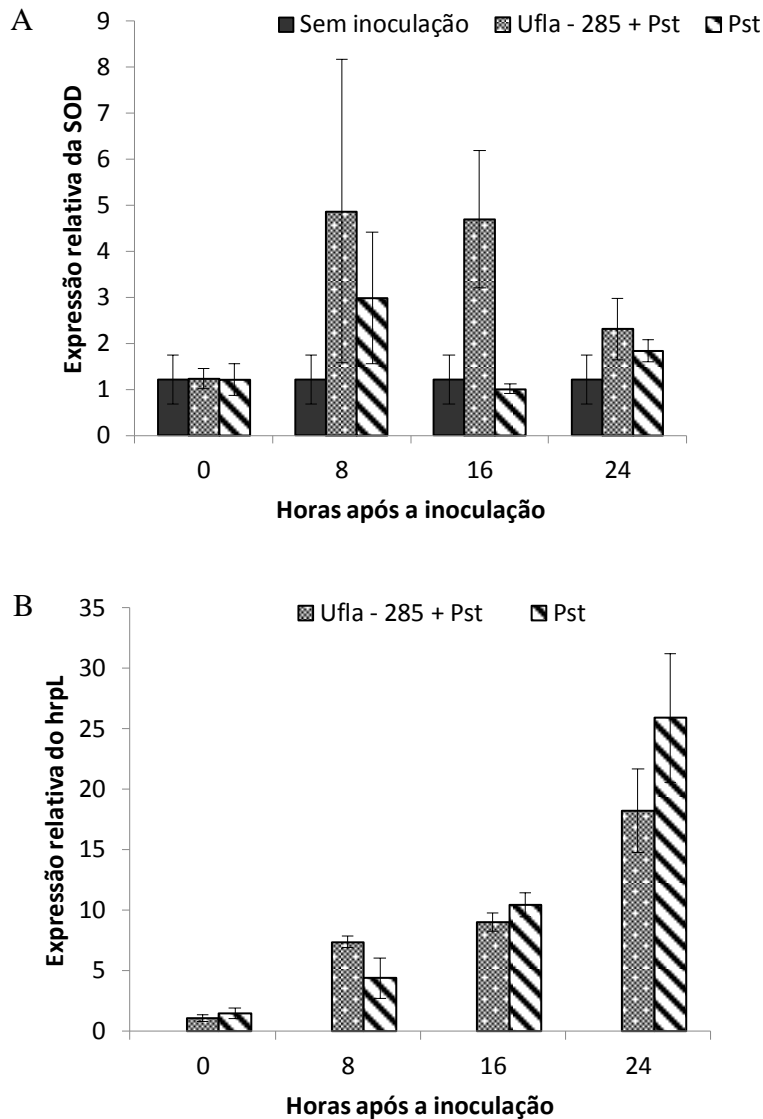


FIGURA 3. Expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes *Superóxido dismutase (SOD)* (A) e *hrpL* (B), em plantas de tomate bacterizadas com o isolado endofítico Ufla – 285, às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação com *P. syringae* pv. *tomato*. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* e *16S*, respectivamente.

Houve um aumento significativo na atividade enzimática da PAL nas plantas de tomate tratadas com o isolado Ufla – 285 às 8 e 16 h com *P. syringae* pv. *tomato*, diferindo

das plantas pulverizadas apenas com água ou inoculadas apenas com a bactéria fitopatogênica (Figura 4A).

A maior atividade da enzima POX foi verificada em plantas tratadas com o isolado Ufla – 285 e inoculadas com *Pst* no momento da inoculação e às 16 hai, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Em plantas inoculadas apenas com *Pst*, às 8 hai, houve maior atividade enzimática da POX (Figura 4B).

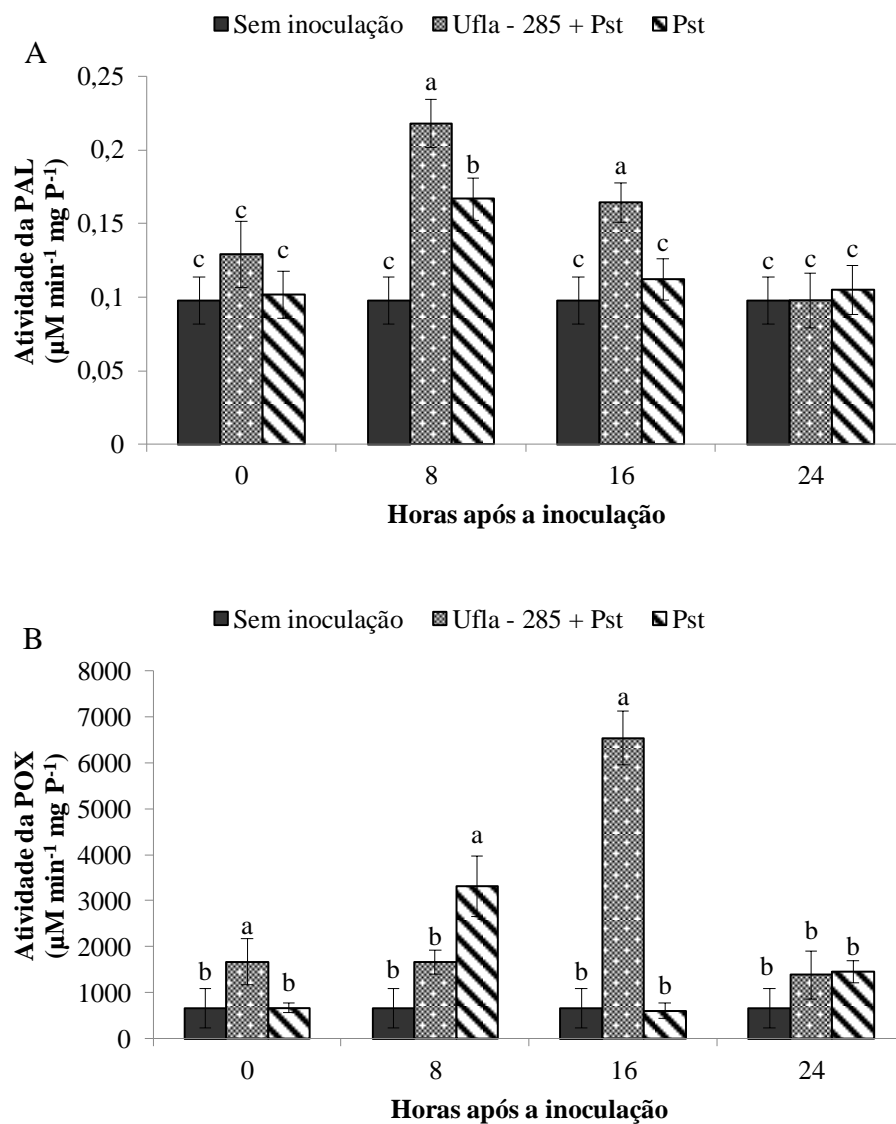
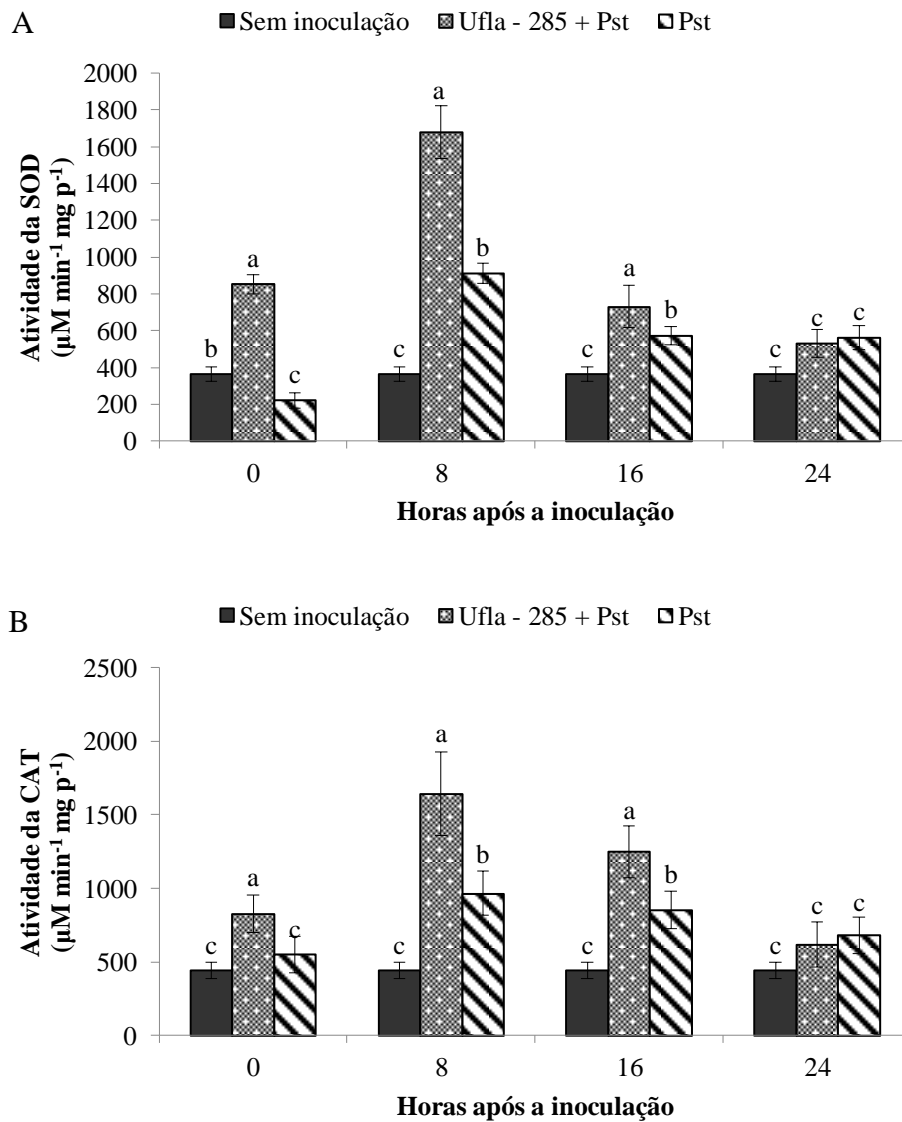


FIGURA 4. Atividade de enzimas de defesa: fenilalanina amônia-liase (PAL) (A) e peroxidase (POX) (B), em plantas de tomate, bacterizadas ou não com o isolado Ufla – 285, às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Como controle foram utilizadas plantas não inoculadas.

Houve aumento significativo na atividade das enzimas SOD e CAT em plantas de tomate bacterizadas com o isolado endofítico Ufla – 285 às 0, 8 e 16 hai com *Pst*, diferindo dos demais tratamentos (Figura 5A e 5B).

Verificou-se que houve aumento da atividade da APX em plantas de tomate tratadas com o isolado endofítico Ufla – 285 e inoculadas com *Pst*, em todos os tempos avaliados. Às 24 hai, plantas inoculadas apenas com a bactéria fitopatogênica apresentaram maior atividade da APX (Figura 5C).



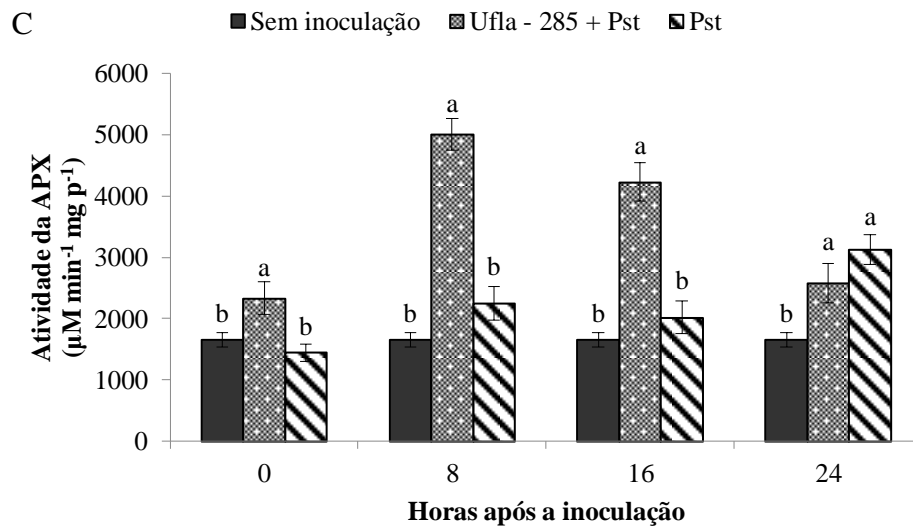


FIGURA 5. Atividade das enzimas de defesa superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C), em plantas de tomate, bacterizadas ou não com o isolado Ufla – 285, às 0, 8, 16 e 24 horas após a inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Como controle foram utilizadas plantas não inoculadas.

#### 4 DISCUSSÃO

O uso de agentes de controle biológico de doenças de plantas tem se tornado um meio vantajoso para os sistemas de produção agrícolas, mostrando-se ecológicos, sustentáveis e economicamente viáveis (Sousa et al. 2009; Chen et al. 2016). Bactérias endofíticas como as do gênero *Bacillus* sp., são de grande importância em programas de controle biológico, devido a capacidade de sintetizar metabólitos bioativos e à alta capacidade de antagonismo, resultante de compostos antimicrobianos, o que auxilia no desempenho do hospedeiro e impede a colonização por organismos patogênicos (Islam et al. 2010; Li et al. 2012; Souza et al. 2015).

No presente estudo, 67% dos isolados endofíticos estudados apresentaram algum potencial de antagonismo *in vitro*. As maiores atividades antagônicas foram obtidas com os isolados Ufla - 22, 285 e 20, que apresentaram halos de inibição de 1,22, 1,14 e 0,96 cm, respectivamente (Tabela 2). Campos Silva et al. (2008) avaliaram o potencial de 52 isolados endofíticos em inibir o crescimento de *P. syringae* pv. *tomato*, e 23 isolados apresentaram antagonismo *in vitro* ao patógeno. Nos estudos realizados por James e Mathew (2015), 31

bactérias endofíticas de tomateiro apresentaram reação antagônica *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum*.

Em sua maioria, estudos *in vitro* são úteis para identificar possíveis agentes de controle biológico, e para entender os mecanismos pelos quais eles inibem patógenos (Mejia et al. 2008). Alguns mecanismos pelos quais os antagonistas suprimem o crescimento de patógenos são a produção de metabólitos voláteis, enzimas líticas e proteínas antagonistas (James e Mathew, 2015).

Contudo, apenas a capacidade dos microrganismos em inibir a multiplicação do patógeno sob condições *in vitro*, não implica necessariamente a mesma habilidade *in vivo*, pois outros mecanismos de controle como a indução de resistência, podem estar envolvidos nesse processo (James e Mathew, 2015). Isso foi comprovado por Ran et al. (2005), que relataram que *Pseudomonas fluorescentes* apresentaram potencial de antagonismo *in vitro*, mas não foram eficaz em condições de campo na supressão da murcha bacteriana em eucalipto.

No presente estudo, quando se comparou a eficácia *in vitro* e *in vivo* dos isolados, observou-se que, os isolados que apresentaram as menores AACPSDs, também apresentaram atividade antagônica frente ao patógeno. Isso sugere que esses isolados endofíticos atuam controlando a doença por antibiose e podem também estar induzindo a resistência da planta, o que eleva os mesmos, ao “*status*” de bons agentes de controle biológico.

Quando se avaliou isoladamente a eficácia de bactérias endofíticas no controle da pinta bacteriana em casa de vegetação, observou-se que oito isolados controlaram eficientemente a doença, diferindo estatisticamente do controle e dos demais isolados, apresentando reduções na severidade da doença que variaram de 39% a 56%, quando comparados ao tratamento controle (100% de doença). A eficácia desses isolados pode ser confirmada também através da taxa de progresso da doença, pois é possível observar que as bactérias que apresentaram as menores taxas de progresso da doença no tempo, apresentaram também as menores AACPSDs (Tabela 3).

Os resultados obtidos com esse estudo corroboram com os obtidos por Lanna Filho et al. (2013), que avaliaram a atividade de biocontrole das bactérias endofíticas *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens* sobre *P. syringae* pv. *tomato*. Esses autores mostraram que as duas bactérias endofíticas foram capazes de reduzir drasticamente a população de *P. syringae* pv. *tomato* e o número de lesões em folhas de tomateiro. Da mesma forma, Barretti et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, com percentuais de controle da pinta bacteriana variando entre 11% e 70%. Campos Silva et al. (2008) encontraram nove

isolados endofíticos eficazes no controle da pinta bacteriana do tomateiro em condições de casa de vegetação, com percentual de controle de até 50% de redução da doença, com o isolado *P. macerans*, que também inibiu o crescimento de *P. syringae* pv. *tomato* *in vitro*.

Contudo, para que sejam considerados bons agentes de controle biológico de doenças de plantas, os microrganismos endofíticos precisam ter a capacidade de ativar respostas de defesa da planta contra o patógeno. Isso ocorre através da resistência sistêmica induzida (ISR), mediada pela rota do ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). Com isso, a ISR pode ser ativada por agentes de biocontrole ou por substâncias sintetizadas pelos mesmos, as quais apresentam amplo espectro de ação contra diversos patógenos (Pieterse e Van Loon, 2004; Romeiro et al. 2005; Lanna Filho et al. 2010; Adam et al. 2014).

A fim de verificar o fenômeno de ISR, avaliou-se a expressão do gene de defesa *SOD* da planta e o gene de patogenicidade *hrpL* de *Pst*. A atividade das enzimas de defesa da planta, PAL, POX, SOD, APX e CAT, também foram determinadas nesse estudo.

O isolado Ufla – 285 foi escolhido para essas avaliações, por apresentar o melhor resultado na redução da severidade da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação. Observou-se que esse tratamento foi capaz de induzir respostas de defesa no hospedeiro. Plantas que receberam o isolado Ufla – 285 como tratamento tiveram aumento na transcrição do gene de defesa *SOD* (Figura 3A), e menor expressão do gene de patogenicidade *hrpL*, quando comparado ao tratamento que recebeu apenas a inoculação da bactéria fitopatogênica *P. syringae* pv. *tomato*, às 16 e 24 hai (Figura 3B). Além disso, esse isolado endofítico proporcionou um incremento significativo na atividade das enzimas de defesa PAL, POX (Figuras 4A, B), SOD, CAT e APX (Figuras 5A, B, e C, respectivamente), em plantas de tomate inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato*.

Após o reconhecimento do patógeno, a explosão oxidativa é a primeira resposta de defesa da planta, que constitui a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ), que embora ocorram normalmente no metabolismo celular, quando acumuladas, são tóxicas às células. Isso geralmente ocorre em plantas sob estresse, que acabam usando um complexo sistema de defesa composto por antioxidantes não enzimáticos e enzimas de defesa, como a SOD, CAT, POX, glutatona redutase e APX, que são usadas para limpar as EAOs e proteger as células de danos oxidativos (Hossain e Uddin, 2011; Saed-Moucheshi et al. 2014; Monteiro et al. 2016).

Verificou-se com esse estudo, que o isolado Ufla – 285 provavelmente possui eliciadores que disparam respostas de defesa da planta. Esse fato é comprovado com o aumento nos níveis das atividades das enzimas POX, SOD, CAT e APX, relacionadas à



limpeza de radicais livres. Esse aumento nas atividades enzimáticas começou no momento da inoculação, se mantendo elevadas as 8 e 16 hai com *P. syringae* pv. *tomato*, o que sugere que a presença da bactéria endofítica desencadeia a atividade de enzimas antioxidantes e diminui o acúmulo de EAOs, logo no início do processo de infecção pelo patógeno (Figuras 4B, 5A,B,C, respectivamente).

A capacidade de diversas espécies de bactérias endofíticas e rizobactérias em ativar mecanismos de proteção físicos e químicos da planta contra patógenos já foi comprovada (Silva et al. 2004; Van Loon, 2007). Além disso, a indução de resistência pode ocorrer pelo efeito “*priming*” nas células, o que resulta em uma resposta de defesa mais rápida e intensa, logo após o primeiro contato da planta com o patógeno (Walters; Ratsep; Havis, 2013; Yi; Yang; Ryu, 2013). Essa resposta rápida pode ocorrer por meio de eliciadores, que são capazes de ativar os mecanismos de defesa vegetal (Burketova et al. 2015). O efeito “*priming*” possivelmente ocorreu nesse estudo, pois basicamente todas as respostas, tanto enzimáticas quanto de expressão do gene de defesa foram rápidas, demonstrando que, embora a penetração da bactéria fitopatogênica ocorra logo após a inoculação, a resposta da planta ao ataque patogênico, quando na presença do isolado endofítico Ufla – 285, também é rápida.

Corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, Chandrasekaran e Chun (2016) verificaram que plantas de tomateiro inoculadas com *B. subtilis* CBR05 apresentaram menor incidência de podridão mole (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) e tiveram um aumento significativo nas atividades da SOD, CAT, POX e PPO nas plantas tratadas com esse isolado já nas 12 hai. Yadav et al. (2017) também estudaram a atividade antibacteriana de *B. amyloliquefaciens* DSBA-11, através da indução de enzimas relacionadas à defesa para o manejo da murcha bacteriana do tomateiro. Plantas tratadas com o bioagente *B. amyloliquefaciens* DSBA-11 aumentaram significativamente a atividade da SOD, POX, CAT e PPO, nas duas cultivares de tomate testadas, quando comparado com plantas inoculadas apenas com *R. solanacearum*.

O aumento na atividade da SOD leva ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sharma et al. 2012). Já foi comprovado que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um sinalizador chave na resistência a patógenos de plantas (Alscher et al. 2002; Li et al. 2015; Chandrasekaran e Chun, 2016). Contudo, o excesso de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levará a produção de CAT, APX e POX, que são responsáveis por eliminar o acúmulo excessivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células (Chandrasekaran e Chun, 2016; Yadav et al. 2017).

A atividade da APX em plantas tratadas com a bactéria endofítica Ufla – 285, e inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato*, foi elevada em todos os tempos avaliados (Figura 5C). Esses resultados podem ser suportados pelos obtidos por Seo et al. (2012), que avaliaram

a indução de respostas de defesa da bactéria endofítica *B. thuringiensis* GS1 sobre *Rhizoctonia solani*, em plantas de pepino, e verificaram que a atividade da APX aumentou ao longo do tempo, e foi maior aos 5 dias, em plantas tratadas com a endofítica e inoculadas com *R. solani*, do que em plantas inoculadas apenas com *R. solani* e plantas controle.

Esse aumento na atividade da APX pode estar ocorrendo porque a APX é uma importante enzima antioxidante que detoxifica o  $H_2O_2$  acumulado nas células das plantas, da mesma forma que ocorre com o aumento da SOD, CAT e POX nesse estudo. Isso é suportado pelo fato que a APX é capaz de reduzir o excesso de  $H_2O_2$  à  $H_2O$  (água), usando o ascorbato como doador de elétrons nessa reação (Shigeoka et al. 2002; Seo et al. 2012).

Nesse estudo, a atividade da PAL foi elevada às 8 e 16 hai, em plantas que receberam o tratamento com a bactéria endofítica Ufla – 285 e posterior inoculação com *P. syringae* pv. *tomato* (Figura 4A). No estudo conduzido por Yadav et al. (2017), a atividade da PAL foi aumentada continuamente nas duas cultivares de tomate tratadas com *B. amyloliquefaciens* DSBA-11, após a inoculação com *R. solanacearum*. Com base nos resultados obtidos por Chandrasekaran e Chun (2016), plantas de tomate inoculadas com o bioagente *B. subtilis* CBR05 e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, apresentaram aumento nas atividades enzimáticas sistêmicas de PAL e  $\beta$ -1,3-glucanase, e níveis mais altos dos transcritos dos genes PAL e  $\beta$ -1,3-glucanase nas folhas de tomateiro, quando comparadas com plantas inoculadas apenas com o patógeno ou plantas controle.

Os resultados obtidos no presente estudo são congruentes também, com os resultados relatados por Indiragandhi et al. (2008), em que o tratamento de sementes com a rizobactéria *Methylobacterium oryzae* CBMB20, induziu as plantas de tomateiro a sintetizar  $\beta$ -1,3-glucanase, PAL, POX e PPO, quando desafiadas com *P. syringae* pv. *tomato*.

O estudo da expressão de gene de defesa, por meio da técnica de RT-qPCR, demonstrou que plantas que receberam o tratamento com a bactéria Ufla – 285, e a inoculação com *P. syringae* pv. *tomato*, apresentaram maior expressão do gene *Superóxido dismutase* (SOD) às 8 hai, se mantendo elevada às 16 e 24 hai com o patógeno. O aumento na transcrição da SOD serve como indicador da ativação da rota de defesa contra o estresse oxidativo, pela bactéria endofítica Ufla -285, quando da inoculação do patógeno (Figura 3A).

Observou-se também, que quando a bactéria endofítica não está presente na interação, a expressão do gene SOD é relativamente baixa às 8 hai. É importante destacar que o resultado obtido com a técnica de RT-qPCR foi semelhante aos obtidos na atividade enzimática da SOD, comprovando que a presença do isolado Ufla – 285 induz a ISR na planta, contra o ataque da bactéria fitopatogênica. Esse resultado pode ser suportado devido à

ação detoxificadora da SOD, que atua eliminando os efeitos nocivos causados por EAOs, oriundas do processo de exposição oxidativa na planta (Soares e Machado, 2007).

Resultados semelhantes foram obtidos por Gond et al. (2015), em que a presença da bactéria endofítica *B. subtilis* induziu a expressão do gene *SOD* em plantas de milho inoculadas com *Fusarium moniliforme*. Cabanás et al. (2014) relataram em seu estudo a expressão de genes envolvidos na biossíntese de hormônios vegetais e fenilpropanóides, estresse oxidativo e metabolismo de  $\text{Ca}^{2+}$ . A expressão desses genes implicou em respostas sistêmicas de defesa induzida em folhas de plantas de oliva, na interação com a endofítica *Pseudomonas fluorescens* PICF7.

O resultado para análise dos transcritos do gene de patogenicidade *hrpL*, de *P. syringae* pv. *tomato*, mostrou o aumento da expressão de *hrpL*, em todos os tempos avaliados, quando a bactéria endofítica Ufla – 285, esteve ausente na interação (Figura 3B). De acordo com Lee et al. (2015), a cluster de patogenicidade *hrp*, é um dos principais fatores de virulência da bactéria fitopatogênica *P. syringae*, pois o *hrp* é o responsável por desativar o sistema de defesa da planta durante a invasão bacteriana. Além disso, a indução de *hrpL* em *P. syringae* requer duas proteínas específicas, HrpS e HrpR, que são altamente homólogas e formam um heterodímero, crucial para a ativação transcricional da *hrpL* (Xiao et al. 1994; Grimm et al. 1995; Hutcheson et al. 2001; Lee et al. 2015). Baseado nos relatos obtidos por esses autores, os resultados obtidos com a expressão de *hrpL* do presente estudo indicam que, provavelmente a bactéria fitopatogênica foi capaz de desativar os mecanismos de defesa do tomateiro na ausência da bactéria endofítica. Além disso, quando a bactéria endofítica esteve presente na interação, ocorreu menor expressão do gene de patogenicidade *hrpL*, provavelmente devido ao efeito antagônico da bactéria endofítica Ufla – 285, que possivelmente reduziu a população de *P. syringae* pv. *tomato* nas folhas de tomate inoculadas, indicando que esse isolado endofítico, além de indutor de resistência, também atua por antagonismo direto do patógeno.

Assim, com base no presente estudo, pode-se afirmar que a acumulação de enzimas e a expressão de genes de defesa da planta parecem ser um dos mecanismos de controle biológico induzidos pelo isolado Ufla – 285, podendo desempenhar um papel fundamental na defesa contra a infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Esses resultados sugerem também que a expressão de genes e atividade de enzimas antioxidantes mediadas por esse isolado endofítico, desempenham papel fundamental na indução de resistência sistêmica contra a pinta bacteriana do tomateiro.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiar esse estudo, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Fisiologia do Parasitismo, Virologia Molecular e Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA pelo suporte na execução dos experimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam M, Heuer H, Hallmann J (2014) Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PloS one** 9:e90402.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany** 53:1331–1341.
- Anderson D, Prasad K, Stewart R (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology** 109:1247-1257.
- Andrade CCL, Resende RS, Rodrigues FA, Silveira PR, Rios JA, Oliveira JR, Mariano RLR (2013) Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology** 38:028-034.
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories** 8:63.
- Barra VR, Silva R, Ferraz HGM, Macagnan D, Silva HSA, Moura AB, Halfeld- Vieira BA, Mendonça HL, Vieira Júnior JR (2008) Potencialidade antagonística detectada em alguns procariontes agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica** 34:121-126.
- Barretti PB, Romeiro RS, Mizubuti ESG, Souza JT (2009) Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia** 33:2038-2044.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248–254.
- Burketova L, Trda L, Ott PG, Valentova O (2015) Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances** 33:994–1004.

Cabanás CGL, Schilirò E, Corredor AV, Mercado-Blanco J (2014) The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. **Frontiers in Microbiology** 5:1-14.

Cakmak L, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 83:463-468.

Campos-Silva JR, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCP, Castro MAS (2008) Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia** 32:1062-1072.

Chance B, Maehley AC (1995) Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology** 1:764-775.

Chandrasekaran M, Chun SC (2016) Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 80:2277–2283.

Chen X, Pizzatti C, Bonaldi M, Saracchi M, Erlacher A, Kunova GB, Cortesi P (2016) Biological control of Lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endofitic *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology** 7:1-12.

Clemente FMVT, Boiteux LS (2012) **Produção de tomate para processamento industrial**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa.

Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant & Cell Physiology** 34:1023-1028.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309–314.

Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research** 172:79–87.

Grimm C, Aufsatz W, Panopoulos NJ (1995) The hrpRS locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. **Molecular Microbiology** 15:155–165.

Hert AP, Marutani M, Momol T, Robert PD, Olson SM, Jones JB (2009) Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. **Applied and Environmental Microbiology** 75:3323–3330.

Hossain MA, Uddin SN (2011) Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science** 5:1094–1101.

Hutcheson SW, Bretz J, Sussan T, Jin S, Pak K (2001) Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. **Journal of Bacteriology** 183:5589–5598.

Indiragandhi P, Anandham R, Kim K, Yim W, Madhaiyan M, Sa T (2008) Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 24:1037–1045.

Islam SMA, Math RK, Kim JM, Yun MG, Cho JJ, Kim EJ, Lee YH, Yun HD (2010) Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. **Current Microbiology** 61:346–356.

James D, Mathew SK (2015) Antagonistic activity of endophytic microorganisms against bacterial wilt disease of tomato. **International Journal of Current Advanced Research Research** 4:399-404.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57:315–319.

Lanna Filho R, Ferro HM, Pinho RSC (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** 4:12.

Lanna Filho R, Souza RM, Ferreira A, Quecine MC, Alves E, Azevedo JL (2013) Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. **Australasian Plant Pathology** 42:643–651.

Lee JS, Ryu HR, Cha JY, Baik HS (2015) The hrp pathogenicity island of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 is induced by plant phenolic acids. **Journal of Microbiology** 53:725–731.

Li H, Wang X, Han M, Zhao Z, Wang M, Tang Q, Liu C, Kemp B, Gu Y, Shuang J, Xue Y (2012) Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential application in control of replant diseases. **African Journal of Biotechnology** 11:231-242.

Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q, Wang Y (2015) Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. **Frontiers in Microbiology** 6:883.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> method. **Methods** 25:402–408.



Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F (2010) Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology** 11:805–816.

Medeiros FHV, Souza RM, Medeiros FCL, Zhang H, Wheeler T, Payton P, Ferro HM, Paré PW (2011) Transcriptional profiling in cotton associated with *Bacillus subtilis* (UFLA285) induced biotic-stress tolerance. **Plant and Soil** 347:327-337.

Mejia LC, Rojas EI, Maynard Z, Van Bael S, Arnold AE, Hebbar P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control** 46:4-14.

Mioranza TM, Müller MA, Kuhn OJ (2014) *Pseudomonas*: Principais características e espécies fitopatogênicas. **Journal of Agronomic Sciences** 3:74-85.

Monteiro ACA, Resende MLV, Valente TCT, Junior PMR, Pereira VF, Costa JR, Silva JAG (2016) Manganese phosphite in coffee defence against hemileia vastatrix, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology** 164:1043–1053.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology** 22:867–880.

Peretto AJ, Silva CL (2002) **Guia de avaliação de ensaios. Fitopatologia. Escalas diagramáticas e chaves descritivas.** Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento. Hokko do Brasil Indústria Química e Agropecuária Ltda. 50p.

Pieterse CMJ, Van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling. **Current Opinion in Plant Biology** 7:456-464.

Pinho RSC, Campos VP, Souza RM, Silva JRC, Oliveira MS, Pimentel GCS, Costa SAS (2009) Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira** 33:54-60.

Preston GM (2000) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, the right pathogen, of the right plant, at the right time. **Molecular Plant Pathology** 1:263-275.

Ran LX, Liu CY, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM (2005) Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. **Biological Control** 32:111-120.

Romeiro RS, Lanna-Filho R, Vieira JR, Silva HSA, Baracat-Pereira MC, Carvalho MG (2005) Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology** 153:120-123.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters** 278:1-9.

Saed-Moucheshi A, Pakniyat H, Pirasteh-Anosheh H, Azooz MM (2014) Role of ROS as signaling molecules in plants. p. 585–626. In: “Reactive Oxygen Species, Antioxidant Network and Signaling in Plants” (P. Ahmad, ed.). Springer Publication, New York, USA, 635 pp.

Seo DJ, Nguyen DMC, Song YS, Jung WJ (2012) Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 22:407-415.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany** 2012:1–26.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany** 53:1305-1319.

Silva HSA, Romeiro RS, Carrer Filho R, Pereira JLA, Mizubuti ESG, Mounteer A (2004) Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology** 152:371–375.

Soares MAS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas** 1:9-19.

Sousa CS, Soares ACF, Garrido MS (2009) Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia** 68:195-203.

Souza RD, Mendonça EAF, Soares MA (2015) Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica** 41:229-232.

Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology** 119:243–254.

Vidaver AK, Mathys ML, Thomas ME, Schuster ML (1972) Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology** 18:705-713.

Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J (2009) Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology** 27:591–598.

Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany** 64:1263–1280.

Xiao Y, Heu S, Yi J, Lu Y, Hutcheson SW (1994) Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 hrp and hrmA genes. **Journal of Bacteriology** 176:1025–1036.

Yadav DK, Singh D, Kumar N (2017) Induction of defense-related enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* DSBA-11 in resistant and susceptible cultivars of tomato against bacterial wilt disease. **International Journal of Agricultural Research** 12:172-180.

Yi H-S, Yang JW, Ryu C-M (2013) ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. **Frontiers in Plant Science** 4:122.

Yunis H, Bashan Y, Okon Y, Henis Y (1980) Weather dependence yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Plant Disease** 64:937–939.

Zucker M (1965) Induction of phenylalanine de aminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology** 40:779-784.

**ARTIGO 3 Promoção de crescimento de plantas de tomateiro por bactérias endofíticas.**

Bruna Canabarro Pozzebon<sup>1</sup> et al.

Artigo formatado de acordo com as normas de Ciência e Agrotecnologia  
(Versão preliminar)

---

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras/UFLA, Departamento de Fitopatologia/DFP, Lavras, MG, Brasil, 37200-000. Autor para correspondência: [rmagelas@dfp.ufla.br](mailto:rmagelas@dfp.ufla.br).

**RESUMO**

Bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas por meio da solubilização de nutrientes, síntese de fitohormônios e fornecimento de vitaminas. Nesse estudo objetivou-se avaliar o potencial de promoção de crescimento de tomateiro por bactérias endofíticas. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade estimular a germinação, aumentar o vigor de sementes, promover o crescimento de plântulas e plantas de tomate, produzir ácido indol acético e solubilizar fosfato inorgânico. O teste de germinação visou determinar a qualidade fisiológica de sementes, através do vigor e germinação de sementes de tomate submetidas a tratamentos com bactérias endofíticas. Além disso, foram mensurados o comprimento da raiz principal e o desenvolvimento da parte aérea das plântulas. Em condições de casa de vegetação foram avaliados a altura de plantas, número de folhas, peso da massa fresca e seca da raiz e parte aérea. Testes *in vitro* foram desenvolvidos visando avaliar a capacidade dos isolados em produzir AIA e solubilizar fosfato inorgânico. Dos 15 isolados testados, quatro apresentaram índices de vigor, acima de 60%, e quatro isolados, germinação acima de 80%. Para incremento no crescimento de plântulas, 67% dos isolados aumentaram o comprimento das raízes e 53% foram eficazes na alongação da parte aérea. Em casa de vegetação, três isolados se destacaram como potenciais promotores de crescimento, aumentando a altura de plântulas em até 125%, quando comparados com o tratamento controle. A avaliação qualitativa da produção de AIA indicou que apenas os isolados Ufla - 2 e 6 são capazes de utilizar o triptofano como precursor de AIA, e nenhuma bactéria endofítica foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico. Dessa forma, pode-se concluir que os isolados endofíticos apresentam potencial de promoção de crescimento de plantas de tomate.

**PALAVRAS-CHAVE:** germinação, ácido indol acético, sementes.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios do século XXI é produzir alimentos de qualidade, mantendo a alta produtividade de culturas. Para isso, estratégias como o uso de fertilizantes químicos, adubos e pesticidas são estabelecidas frequentemente por produtores. Essas abordagens costumam apresentar bons resultados no que diz respeito à produtividade, mas causam impactos negativos no ambiente, como a lixiviação do nitrato para as águas subterrâneas, escoamento superficial do fósforo e nitrogênio, e eutrofização dos ecossistemas aquáticos (Camargo; Alonso, 2006; Abbamondi et al., 2016).

Em contrapartida, a busca por métodos mais ecológicos, que primem pela sustentabilidade ambiental e ganhos de produtividade, vem se destacando na agricultura nos últimos anos. A integração de métodos alternativos e mais ecológicos (como o uso de microrganismos benéficos) com os métodos convencionais (fertilizantes químicos, adubos e pesticidas), são alguns esforços consideráveis quando se busca por sustentabilidade, redução dos impactos ambientais gerados pela agricultura convencional, redução de custos e aumento dos lucros com a lavoura (Farrar; Bryant; Cope-Selby, 2014).

Bactérias endofíticas são microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas, potencializando o aumento da produção de maneira sustentável (Silva et al., 2012; Hidayati et al., 2014; Rangjaroen et al., 2015). Os principais mecanismos de promoção de crescimento desencadeado por esses microrganismos são a produção de fitohormônios, como o ácido indol acético - AIA (Piromyou et al., 2011; Arun; Gopinath; Sharma, 2012), ácido abscísico, giberélico e citocininas (Feng; Shen; Song, 2006), fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de íons de amônio (Nigris et al., 2013), mineralização de fosfato orgânico (Jha; Kumar, 2007), fornecimento de vitaminas essenciais, aumento da captação e solubilização de minerais, regulação estomática, modificação da morfologia radicular e produção de sideróforos (Ryan et al., 2008). Porém, esses mecanismos terão sucesso, somente se as bactérias endofíticas conseguirem se estabelecer, colonizar, se multiplicar e superar os impedimentos físicos e químicos impostos pelo hospedeiro.

A associação benéfica de plantas com bactérias endofíticas desempenha papel fundamental na segurança agrícola e alimentar, além de contribuir para o equilíbrio ambiental (Mendes; Garbeva; Raaijmakers, 2013). Baseado nisso, vários estudos têm sido desenvolvidos com essa temática, visando demonstrar o potencial desses microrganismos na promoção de crescimento de plantas.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal, como as dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Enterobacter* e *Agrobacterium*, produzem compostos indólicos (AIA), que quando sintetizados e secretados pela bactéria, agem como hormônios de crescimento vegetal e induzem o aumento das raízes e folhas das plantas (Babalola, 2010; Hayat et al., 2010; Yuan et al., 2010). Tariq et al. (2014) estudaram o comportamento *in vitro* de plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.), e observaram que seis isolados de bactérias endofíticas foram capazes de produzir AIA, dois fixaram nitrogênio e nove solubilizaram fósforo inorgânico, contribuindo dessa forma, para o crescimento de plântulas de ervilha. Ji; Gururani; Chun (2014) também estudaram a promoção de crescimento de plantas de arroz, induzida por bactérias endofíticas. Esses autores observaram que alguns isolados foram capazes de produzir auxina, sideróforos e solubilizar fosfato, bem como proporcionaram maior crescimento das plantas e acréscimo no peso seco.

Dessa forma, o estudo desses agentes seria agronomicamente relevante para fins de desenvolvimento de biofertilizantes, o que seria uma alternativa aos fertilizantes químicos utilizados em grande escala em todo mundo. Com isso, objetivou-se com esse estudo, investigar o potencial de isolados bacterianos endofíticos em melhorar a qualidade fisiológica de sementes de tomateiro e promover o crescimento de plantas, em condições laboratoriais e de casa de vegetação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Origem dos microrganismos endofíticos**

Os isolados endofíticos foram obtidos da coleção de isolados bacterianos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram selecionados para o presente estudo, 15 isolados endofíticos, que apresentaram potencial de controle biológico em trabalhos preliminares (Tabela 1).



TABELA 1. Bactérias endofíticas utilizadas como potenciais promotoras de crescimento de plantas de tomate.

<b>Isolado (bactéria endofítica)</b>	<b>Origem:/ Ano</b>
<i>Paenibacillus macerans</i> (Ufla - 37 e 47)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 50)	Campos Silva et al. (2008)/ Lanna Filho et al. (2013)
<i>Bacillus pumillus</i> (Ufla - 2, 12, 20, 39 e 51)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus sphaericus</i> (Ufla - 45)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus</i> sp. (Ufla - 24)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus pumillus</i> (Ufla - 6)	Campos Silva et al. (2008)/ Lanna Filho et al. (2013)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 22)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus megaterium</i> (Ufla - 7)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Paenibacillus gordonae</i> (Ufla - 40)	Campos Silva et al. (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ufla - 285)	Medeiros et al. (2011)

## 2.2 Bacterização de sementes como método de introdução dos agentes endofíticos

Para a realização do teste padrão de germinação (TPG) e para o teste de promoção de crescimento em casa de vegetação, as bactérias endofíticas foram introduzidas, via tratamento de sementes, pelo método de bacterização.

Sementes de tomate da cultivar Santa Clara, foram desinfestadas superficialmente através do método da tríplice lavagem (Pinho et al., 2009). Para o preparo das suspensões bacterianas, foram utilizadas culturas bacterianas, crescidas em meio 523 sólido de Kado & Heskett (1970), com crescimento de 24 h, a 28 °C. Adicionou-se a essas colônias, solução salina de NaCl 0,85%, e realizou-se a raspagem do crescimento bacteriano, com alça de Drigalski, até a obtenção de uma suspensão homogênea de células, ajustadas em espectrofotômetro para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) (Pinho et al. 2009). Posteriormente, as sementes foram imersas nas respectivas suspensões de isolados endofíticos, e bacterizadas por 24 horas em Shaker, a 38 rpm e 28 °C. Como controle negativo, as sementes foram imersas em solução salina de NaCl 0,85%.

### **2.3 Teste padrão de germinação e crescimento de plântulas de tomateiro**

Após o período de bacterização de sementes, foram conduzidos testes de vigor (primeira contagem da germinação), germinação (segunda contagem da germinação), e tamanho de plântulas de tomate, visando caracterizar o lote de sementes e avaliar o potencial dos isolados bacterianos em melhorar a qualidade fisiológica das sementes e estimular o crescimento de plântulas.

A metodologia utilizada seguiu os padrões recomendados pelas Regras de Análises de Sementes (RAS) (Brasil, 2009). No teste de germinação foram utilizadas oito repetições compostas por 50 sementes cada, distribuídas em papel Germitest umedecido com água destilada esterilizada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Após a montagem dos rolos de papel, os mesmos foram acondicionados em temperatura de  $25 \pm 5$  °C, sob fotoperíodo de 12 h, em câmara de crescimento tipo BOD.

A avaliação do vigor de sementes constituiu-se do registro de plântulas normais verificadas na primeira contagem do teste de germinação, realizada aos cinco dias após a semeadura em papel Germitest, conforme os padrões da RAS (Brasil, 2009). Aos 14 dias, foi avaliado o total de plântulas normais, seguindo os padrões estabelecidos pela RAS. Os percentuais de plântulas normais de cada repetição foram computados para avaliação da germinação. Em paralelo à avaliação do teste de germinação, foi verificado também o comprimento da raiz e parte aérea de plântulas de tomateiro, aos 14 dias após a semeadura em papel Germitest.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados, expressos em percentagem de vigor e germinação. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011), em que os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo teste *F*, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

### **2.4 Promoção de crescimento em casa de vegetação**

As bactérias endofíticas foram testadas também quanto à capacidade em promover o crescimento de plantas de tomate, em casa de vegetação. Para isso, sementes da cultivar Santa Clara foram bacterizadas com as suspensões de cada um dos 15 isolados endofíticos, e também com solução salina de NaCl 0,85%, utilizada como controle.

As sementes que receberam os tratamentos com os isolados endofíticos e o tratamento controle, foram semeadas diretamente em vasos de 3 L, a 1 cm de profundidade, contendo mistura de solo, esterco e areia, na proporção 1:1:1 (v/v/v), e cultivadas em casa de vegetação. Aos 40 dias após a germinação foram avaliados os seguintes parâmetros: altura (cm), número de folhas, número de folíolos, peso da matéria fresca da raiz (g), peso da matéria fresca da parte aérea (g), peso da matéria seca da raiz (g) e peso da matéria seca da parte aérea (g) (Barretti; Souza; Pozza, 2008 – com adaptações). Para avaliar a matéria seca, as plantas foram secas em estufa a  $65\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ , durante sete dias.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), com três repetições. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011), submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo teste *F*, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

## 2.5 Produção de ácido indol acético (AIA)

A produção de AIA foi determinada seguindo a metodologia de Bric; Bostock; Silverstone (1991), adaptada por Cattelan (1999). Para isso, os isolados endofíticos foram crescidos em meio GNA sólido (20 g caldo nutriente, 5 g glicose, 20 g de ágar, 1000 mL água destilada – pH 6,8), por 24 h, a 28 °C. Após o crescimento, as colônias foram postas em suspensão em solução salina de NaCl 0,85% e ajustadas em espectrofotômetro para  $OD_{540} = 0,5$  ( $\sim 10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ) (Pinho et al., 2009). Depois de ajustadas as absorbâncias, 0,5  $\mu\text{L}$  de suspensão de cada bactéria endofítica foi repicada na forma de gota para placas de Petri, contendo meio de cultura Tripticaseína de soja (TSA 1/10), enriquecido com 5mM de L-triptofano.

Cada gota de 0,5  $\mu\text{L}$  de isolado endofítico foi coberta por uma membrana de nitrocelulose (25 mm) e posteriormente as placas foram incubadas a 28 °C, por 24 h, para crescimento das culturas bacterianas. Após o período de crescimento, as membranas foram removidas e saturadas com solução Salkowski (1 mL de solução  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5M; 50 mL  $\text{HClO}_4$  35%) (Gordon; Weber, 1951). As membranas saturadas com solução Salkowski, foram posicionadas novamente sobre os respectivos crescimentos bacterianos, e as placas, mantidas em temperatura ambiente, por um período de 2 h. Como controle negativo foi utilizada membrana de nitrocelulose imersa apenas em solução Salkowski. A análise foi qualitativa, e os isolados que produziram pigmento avermelhado na membrana, foram

considerados positivos na produção de AIA. Para cada isolado, foram realizadas cinco repetições.

## 2.6 Solubilização de fosfato inorgânico

A avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, foi realizada seguindo a metodologia descrita por Santos et al. (2012). Para isso, as bactérias foram crescidas em meio GNA sólido, por 24 h, a 28 °C e postas em suspensão, com solução salina de NaCl 0,85%. As suspensões bacterianas foram padronizadas em espectrofotômetro para  $OD_{540} = 0,5$  ( $10^8$  ufc  $mL^{-1}$ ) (Pinho et al., 2009), e posteriormente, repicadas por pontos equidistantes, 0,5  $\mu L$  de suspensão de cada bactéria endofítica na forma de gota, em placas de Petri contendo meio de cultura sólido Fosfato de cálcio bibásico, que contém fosfato insolúvel (10g/L glicose; 5 g/L de  $NH_4Cl$ ; 1 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 4 g/L de  $CaHPO_4$ ; 15 g/L de Ágar; pH 7,2). As culturas foram incubadas a 28°C, por 15 dias em câmara de crescimento tipo BOD. A análise foi qualitativa, sendo considerado a formação de área clara (halo translúcido) ao redor das colônias, resultado positivo para solubilização fosfato. O experimento foi composto por cinco repetições.

## 3 RESULTADOS

Todos os isolados endofíticos testados propiciaram índices de vigor superiores ao tratamento controle. Os isolados Ufla - 37, 285, 6 e 51 foram os que proporcionaram os índices mais significativos (67%, 67%, 67% e 61%, respectivamente), sendo estatisticamente superiores aos demais isolados e tratamento controle, que proporcionou apenas 1% de vigor de sementes de tomate (Tabela 2). Os isolados Ufla - 37, 12, 40 e 45 apresentaram índices de germinação acima de 80%, sendo substancialmente superiores ao tratamento controle, que propiciou apenas 29% de germinação das sementes (Tabela 2). Além disso, os isolados Ufla - 285, 20, 6, 12, 51, 24, 22, 39, 47, 2, 7 e 50 também propiciaram melhores índices de germinação de sementes de tomate quando comparados com o tratamento controle (Tabela 2).

TABELA 2. Vigor (%) e germinação (%) de sementes de tomate, em resposta à introdução de isolados bacterianos endofíticos.

<b>Isolado Ufla</b>	<b>Vigor (%)</b>	<b>Germinação (%)</b>
<i>P. macerans</i> - 37	67 a*	83 a*
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 285	67 a	79 a
<i>B. pumillus</i> - 20	50 b	75 a
<i>B. pumillus</i> - 6	67 a	79 a
<i>B. pumillus</i> - 12	47 b	82 a
<i>B. pumillus</i> - 51	62 a	78 a
<i>P. macerans</i> - 47	47 b	70 b
<i>P. gordonae</i> - 40	54 b	83 a
<i>B. sphaericus</i> - 45	48 b	81 a
<i>Bacillus</i> sp. - 24	34 b	74 a
<i>B. pumillus</i> - 2	44 b	69 b
<i>B. megaterium</i> - 7	41 b	68 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 22	46 b	77 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> - 50	50 b	61 b
<i>B. pumillus</i> - 39	43 b	72 b
Controle	1 c	29 c
CV (%)	18,16	9,46

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

No ensaio de crescimento de plântulas de tomate, que visou avaliar a capacidade dos isolados endofíticos em promover o aumento do crescimento da raiz e alongação da parte aérea, 10 isolados (67% do total) foram eficazes em aumentar o comprimento da raiz (Figura 1), e oito (53% do total), eficazes em aumentar o comprimento da parte aérea (Figura 1), quando comparados com o tratamento controle (sementes bacterizadas com solução salina de NaCl 0,85%). Além disso, 53% dos isolados foram eficazes no aumento dos dois parâmetros avaliados (Figura 1). Destes, o isolado 37 foi o mais promissor para os dois parâmetros, pois apresentou incremento de 7,42 cm no comprimento da raiz, e de 2,51 cm no comprimento da parte aérea, quando comparado com o controle.

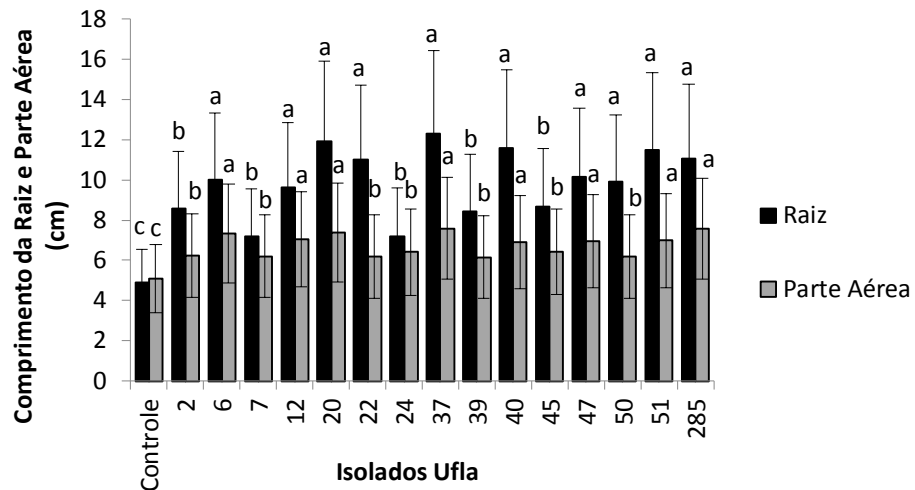


FIGURA 1. Isolados bacterianos endofíticos na promoção do crescimento das raízes e parte aérea de plântulas de tomate. Tratamento controle: Solução salina (NaCl 0,85%). As colunas representam as médias e as barras verticais representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Onze isolados aumentaram significativamente a altura de plantas em casa de vegetação. Desses, três isolados (Ufla – 37, 285 e 47) se destacaram como mais eficazes, diferindo estatisticamente dos demais isolados bacterianos, e controle. O isolado Ufla – 37 promoveu aumento de 11,33 cm (125% de incremento), na altura de plantas de tomate. Não houve diferença estatística entre os isolados endofíticos e o tratamento controle, quando se avaliou o número de folhas das plantas. Treze isolados foram eficientes em aumentar o número de folíolos das plantas de tomate aos 40 dias de idade (Tabela 3).

Sete isolados foram eficazes em aumentar o peso da matéria fresca da parte aérea, e onze, promoveram incrementos no peso da matéria fresca da raiz. Desses, o isolado Ufla – 40 se destacou como o mais eficaz em aumentar o peso da matéria fresca dos dois parâmetros (parte aérea e raiz), com incrementos de 160 e 154%, respectivamente, quando comparado com o tratamento controle (100% de crescimento) (Tabela 3).

Seis isolados endofíticos aumentaram o peso da matéria seca da parte aérea. O isolado Ufla – 285 foi o mais eficaz, promovendo incrementos de 173% quando comparado ao tratamento controle. Além disso, sete isolados aumentaram o peso da matéria seca da raiz,

sendo o isolado Ufla – 40 o mais promissor, com incrementos de 135%, quando comparado com o tratamento controle (Tabela 3).

TABELA 3. Promoção de crescimento de plantas de tomateiro por bactérias endofíticas em casa de vegetação. Parâmetros avaliados: Altura (cm), número de folhas, número de folíolos, massa fresca da parte aérea e raiz (MF PA, MF R), massa seca da parte aérea e raiz (MS PA, MF R).

Promoção de crescimento							
Isolado Ufla	Altura (cm)	Nº de folhas	Nº de folíolos	MF PA (g)	MF R (g)	MS PA (g)	MS R (g)
37	55,96 a*	8,5 a*	83,77 a*	63,96 a*	11,14 a*	4,96 b*	0,67 b*
285	54,17 a	8,3 a	77,27 a	61,58 a	12,21 a	6,47 a	0,80 b
47	54,00 a	8,0 a	68,67 b	56,15 b	11,86 a	5,00 b	0,69 b
40	52,70 b	8,0 a	80,50 a	70,26 a	12,92 a	6,21 a	0,97 a
7	52,28 b	8,3 a	79,17 a	63,80 a	8,76 b	6,11 a	0,88 a
12	52,28 b	7,7 a	73,00 a	47,07 b	11,65 a	4,96 b	0,87 a
6	52,20 b	7,7 a	83,27 a	56,61 b	9,97 b	4,98 b	0,63 b
24	51,93 b	8,7 a	68,77 b	69,23 a	11,92 a	4,97 b	0,74 b
50	51,62 b	7,8 a	78,67 a	62,27 a	11,48 a	5,59 a	0,95 a
20	51,33 b	8,2 a	80,27 a	51,09 b	10,35 b	4,56 b	0,74 b
45	50,90 b	8,0 a	75,50 a	56,77 b	12,73 a	5,55 a	0,95 a
2	47,45 c	8,0 a	78,50 a	54,84 b	11,71 a	5,28 b	0,89 a
22	47,38 c	8,2 a	78,00 a	58,69 b	9,86 b	4,76 b	0,67 b
39	47,08 c	8,5 a	82,50 a	69,32 a	12,61 a	5,65 a	0,81 a
51	44,90 c	8,0 a	76,27 a	62,53 b	10,96 a	4,77 b	0,77 b
Controle	44,63 c	7,5 a	59,00 c	43,77 b	8,04 b	3,73 b	0,72 b
<b>CV (%)</b>	<b>3,52</b>	<b>6,39</b>	<b>5,99</b>	<b>10,97</b>	<b>14,71</b>	<b>13,47</b>	<b>9,27</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Na avaliação qualitativa da produção de ácido indol acético, apenas os isolados Ufla – 2 e 6, foram capazes de utilizar o triptofano como precursor de AIA (Figura 2). Contudo, nenhum isolado endofítico foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico, indicando que esse não é um mecanismo pelo qual promovem o crescimento de plantas.



FIGURA 2. Análise qualitativa da produção de Ácido Indo Acético (AIA) pelos isolados Ufla – 2 e 6. Isolado Ufla – 7 não produziu AIA nas condições *in vitro*. Círculos em preto indicam os isolados capazes de usar o triptofano como precursor de AIA.

#### 4 DISCUSSÃO

Microrganismos promotores de crescimento apresentam a capacidade de se associar a diferentes espécies de plantas, e com isso, reprogramam o crescimento de seus hospedeiros, melhorando a fisiologia e a sinalização fitohormonal da planta, durante o ataque de fitopatógenos (Kloepper; Ryu; Zhang, 2004; Rosenblueth; Martínez-Romero, 2006). Além disso, são também conhecidos por auxiliar os hospedeiros na defesa contra estresses físico-químicos, como salinidade, osmótico e metais pesados (Kang; Radhakrishnan; Lee, 2015; Choudhary et al., 2016).

Frequentemente, espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., são conhecidas pelo potencial de promoção de crescimento de plantas, capazes de aumentar substancialmente o crescimento e a produtividade de diversas culturas. Devido à suas propriedades como biofertilizadores e biocontroladores naturais, podem ser considerados substitutos parciais para fertilizantes e pesticidas (Gajbhiye et al., 2010; Qiao et al., 2014; Shahzad et al., 2017).



Foi demonstrado neste estudo que bactérias endofíticas podem agir positivamente no desenvolvimento de plantas de tomate, como fitoestimuladoras do crescimento vegetal, tal qual reportado para outras culturas (Jasim et al., 2014; Ji; Gururani; Chun, 2014; Rangjaroen et al., 2015).

Os dados obtidos no TPG revelaram que, quatro isolados promoveram em sementes de tomate, índices de vigor acima de 60% (isolados Ufla – 37, 285, 6 e 51) e 10 isolados os maiores índices de germinação, diferindo estatisticamente quando comparados com o tratamento controle (Tabela 2). Verificou-se que as bactérias endofíticas tiveram resultados positivos para vigor e germinação. Esses resultados são congruentes com os obtidos por Piccinin et al. (2015), em que o uso de doses de nitrogênio, conjugadas à inoculação com *Azospirillum brasilense*, resultaram em acréscimos no vigor e ganhos satisfatórios na qualidade fisiológica das sementes de trigo, de modo que a inoculação com bactérias endofíticas pode acarretar em sementes com maior qualidade. Lee et al. (2006) verificaram que a inoculação das sementes com bactérias diazotróficas favoreceu a germinação e o índice de velocidade de germinação de sementes de arroz. Araújo et al. (2010) verificaram que sementes de arroz inoculadas com rizobactérias também apresentaram aumento no vigor e germinação.

Estudos demonstram que as bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta através da produção de fitohormônios, produção de sideróforos, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, ou a atividade enzimática (Berg; Hallmann, 2006), bem como fornecer vitaminas essenciais para as plantas, aumentar a captação e solubilização de minerais e modificação da morfologia radicular (Ryan et al., 2008).

No ensaio de crescimento de raiz e parte aérea de plântulas de tomateiro, 10 isolados tiveram ação positiva sobre o crescimento da raiz (Figura 1) e oito, na elongação da parte aérea (Figura 1). Já é conhecido que o estímulo positivo para o crescimento de plantas por bactérias pode ocorrer pela síntese de giberelinas, ácido láctico e succínico e produção de AIA, resultando no aumento tanto da raiz quanto da parte aérea da plântula (Holl et al., 1988; Yoshikawa, 1993; Glick, 2012). Notadamente, os 10 isolados que estimularam o crescimento da raiz e os oito, que estimularam o aumento da parte aérea, possivelmente podem ter produzido algumas dessas substâncias, possibilitando o aumento ou regulação positiva dos fitohormônios endógenos.

O isolado Ufla – 37 se destacou por ser o mais eficaz em promover o crescimento da raiz e da parte aérea, com incrementos de 7,42 cm no comprimento da raiz e 2,51 cm de aumento na parte aérea. Esse fenômeno pode estar relacionado com a síntese de giberelina e

auxina, que estimulam o crescimento da parte aérea e da raiz de plantas, respectivamente (Glick, 1995; Bottini; Cassán; Piccoli, 2004; Jones et al., 2007; Kang et al., 2014).

Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, Kang et al. (2014) constataram o aumento substancial da parte aérea, da massa fresca e clorofila, de plantas de arroz, estimulados pela síntese de giberelina quando inoculadas com a bactéria *Leifsonia soli* SE134. Já Zamioudis et al. (2013), verificaram que três bactérias endofíticas isoladas de mudas de *Arabidopsis*, foram capazes de estimular a produção de biomassa vegetal, ocorrendo acréscimos de até 3,9 vezes na produção de massa fresca das mudas, em condições *in vitro*.

Shahzad et al. (2017), confirmaram o efeito promotor de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1, que foi capaz de produzir uma gama de metabólitos secundários, fitohormônios como giberelinas, e ácidos orgânicos, os quais promovem o crescimento de plantas e melhoria de estresses bióticos e abióticos, podendo ainda melhorar a resistência ao estresse à seca, de salinidade e temperatura, além da resistência contra ataques de fitopatógenos.

Em casa de vegetação, onze isolados se destacaram como bons promotores de crescimento de plantas de tomateiro. De maneira geral, os isolados Ufla – 37, 285 e 47, proporcionaram acréscimos significativos na altura das plantas, possivelmente porque desencadearam mecanismos que potencializaram a absorção de nutrientes e/ou síntese de fitohormônios. Plantas de tomate inoculadas com esses três isolados apresentaram altura de 55,96 cm, 54,17 cm e 54 cm, respectivamente. Com relação ao número de folhas, não houve diferença estatística entre os isolados endofíticos e o tratamento controle. Porém 13 isolados foram altamente eficientes em aumentar o número de folíolos de plantas de tomateiro aos 40 dias de idade (Tabela 3).

Para o peso da matéria fresca da raiz e parte aérea, o isolado Ufla – 40 foi o mais eficaz, promovendo incrementos de 154 e 160%, respectivamente, quando comparados ao controle (100% de crescimento). O isolado Ufla – 285 foi o mais eficaz para o peso da matéria seca da parte aérea, com incrementos de 173% quando comparado ao tratamento controle. Já ao avaliar-se a matéria seca da raiz, novamente o isolado Ufla – 40 foi o mais promissor, apresentando incrementos de 135% (Tabela 3).

De maneira semelhante, Barretti et al. (2009), avaliaram o crescimento de plantas de tomateiro induzido por bactéria endofíticas. No estudo conduzido por esses autores, o isolado UFV – E13 proporcionou aumento de 15,16% nas plantas tratadas. Shahzad et al. (2017), verificaram o crescimento de plantas de tomate, induzido pela bactéria endofítica *Bacillus*

*amyloliquefaciens* RWL-1, e observaram que esse isolado maximizou o comprimento da parte aérea (28,23%), comprimento da raiz (149,14%), peso fresco e seco (168,68% e 175,47%) e teor de clorofila (27,62%), quando comparado ao controle.

Em estudo de Paz et al. (2012) o isolado endofítico EUCB 13 apresentou aumento do comprimento da parte aérea de eucalipto, porém a maior atividade ocorreu no sistema radicular, que teve aumento de até 24,8% no comprimento da raiz principal. Ji; Gururani e Chun, (2014), trataram sementes de arroz com bactérias endofíticas diazotróficas e observaram o aumento da altura das plantas e maior peso seco, além de efeitos antagônicos contra fungos patogênicos. Esses autores verificaram que 10 isolados produziram auxina, seis apresentaram alta produção de sideróforos e quatro isolados, solubilizaram fosfato.

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento por bactérias endofíticas do presente estudo, realizou-se o teste de produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato orgânico. As avaliações qualitativas mostraram apenas os isolados Ufla – 2 e 6 como potenciais na utilização de triptofano (Figura 2), e nenhum isolado eficaz na solubilização de fosfato inorgânico. Em trabalho semelhante, Devi et al. (2017) verificaram que o isolado endofítico *Pseudomonas aeruginosa* AL2-14B, apresentou atributos estimuladores do crescimento de plantas de *Achyranthes aspera* L, incluindo liberação de sideróforos, AIA, solubilização de fosfato inorgânico, juntamente com atividades de nitrogenase, amonificação e protease.

De acordo com Strobel (2003), microrganismos endofíticos produzem diversos compostos bioativos e enzimas para sobreviver na planta hospedeira. Suas atividades metabólicas aumentam o crescimento e o desenvolvimento de plantas, através da produção de reguladores de crescimento, fixação de N, síntese de deaminase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), solubilização de fosfato e/ou mecanismo indireto de resistência a doenças, através da produção de metabólitos ou sideróforos antimicrobianos que inibem microorganismos patogênicos (Sun et al., 2009; Ji et al., 2014; Abbamondi et al., 2016; Khan et al., 2016).

Possíveis mecanismos envolvidos na promoção de crescimento desse estudo, além da produção de AIA, podem ser produção de sideróforos, fixação de nitrogênio e a produção de outros fitohormônios, como giberelinas, citocininas, e ácido abscísico, que desempenham papel fundamental no crescimento vegetal.

## **5 CONCLUSÕES**

De maneira geral, os isolados Ufla - 37, 285, 6 e 51 propiciaram os melhores índices de vigor de sementes e os isolados Ufla - 37, 12, 40 e 45, os melhores índices de germinação. Onze isolados se destacaram em promover o crescimento de plantas em casa de vegetação. Os isolados Ufla – 2 e 6 foram capazes utilizar o triptofano como precursor de AIA e nenhum isolado solubilizou fosfato inorgânico.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiar esse estudo, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, UFLA pelo suporte na execução dos experimentos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAMONDI, G. R.; TOMMONARO, G.; WEYENS, N.; THIJS, S.; SILLEN, W.; GKOREZIS, P.; IODICE, C.; RANGEL, W. M.; NICOLAUS, B.; VANGRONSVELD, J. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 3(1):1-10, 2016.

ARAÚJO, A. E. S.; ROSSETTO, C. A. V.; BALDANI, V. L. D.; BALDAN, J. I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(4):932-939, 2010.

ARUN, B.; GOPINATH, B.; SHARMA, S. Plant growth promoting potential of bacteria isolated on N free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(9):2849–2857, 2012.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology letters**, 32(11):1559-1570, 2010.

BARRETTI, P. B.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SOUZA, J. T. Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, 33(Edição especial):2038-2044, 2009.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, 32(3):731-739, 2008.

BERG, G.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: **Microbial Root Endophytes** (Schulz, B.; Boyle, C.; Sieber, T. N. eds.). Springer-Verlag, Berlin, 53-66, 2006.

BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65(5): 497–503, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) **Regras para análise de sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, 57(2):535-538, 1991.

CAMARGO JA, ALONSO A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. **Environment International**, 32(6):831–849, 2006.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p.

CHOUDHARY, D. K.; KASOTIA, A.; JAIN, S.; VAISHNAV, A.; KUMARI, S.; SHARMA, K. P.; VARMA, A. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**, 35(1):276–300, 2016.

DEVI K. A.; PANDEY, G.; RAWAT A. K. S.; SHARMA, G. D.; PANDEY, P. The endophytic symbiont—*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. **Frontiers in Microbiology**, 8(1897):1-14, 2017.

FARRAR, K.; BRYANT, D.; COPE-SELBY, N. Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. **Plant Biotechnology Journal**, 12(9):1193–1206, 2014.

FENG, Y.; SHEN, D.; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, 100(5):938–945, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35(6):1039-1042, 2011.

GAJBHIYE, A.; RAI, A. R.; MESHARAM, S. U.; DONGRE, A. B. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26(7):1187–1194, 2010.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. **Scientifica**, 2012(1):1-15, 2012.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, 41(2):109-117, 1995.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, 26(1):192-195, 1951.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, 60(4):579-598, 2010.

HIDAYATI, U.; CHANIAGO, I.A.; MUNIF, A.; SANTOSA, D.A. Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from Rubber plants (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.). **Journal of Agronomy**, 13(3):147-152, 2014.

HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R. A. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, 20(1):19-24, 1988.

JASIM. B.; JOSEPH, A. A.; JOHN, C. J.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. **3 Biotech** 4(2):197–204, 2014.

JHA, P. N.; KUMAR, A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. **Journal of Applied Microbiology**, 103(4):1311–1320, 2007.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, 169(1):83– 89, 2014.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. **Nature Reviews Microbiology**, 5(8): 619-633, 2007.

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

KANG, S. M.; KHAN, A. L.; YOU, Y. H.; KIM, J. G.; KAMRAN, M.; LEE, I. J. Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 24(1):106–112, 2014.

KANG, S. M.; RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I-J. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 31(10):1517–1527, 2015.

KHAN, A. L.; HALO, B. A.; ELYASSI, A.; SAJID, A.; AL-HOSNI, K.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, A.; LEE, I-J. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, 21(1):58–64, 2016.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C-M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, 94(11):1259–1266, 2004.

LEE, H. S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C. W.; CHOI, S. J.; CHUNG, K. Y. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N<sub>2</sub>-fixing methylotrophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, 42(5):402-408, 2006.



MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5):634–63, 2013.

NIGRIS, S.; BALDAN, E.; ZOTTINI, M.; SQUARTINI, A.; BALDAN, B. Is the bacterial endophyte community, living in Glera (*Vitis vinifera*) plants, active in biocontrol? In: SCHNEIDER, C.; LEIFERT, C.; FELDMANN, F. (Eds.) *Endophytes for plant protection: the state of the art*. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig. pp. 12-16, 2013.

PAZ, I. C. P.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A. M.; ROSA, O. P. P.; DIAS, A. C. F.; QUECINE, M. C.; AZEVEDO, J. L.; MATSUMURA, A. T. S. Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research**, 11(4):3711-3720, 2012.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. L. M.; SCAPIM, C. A.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K. Inoculação das sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* associada à aplicação de biorregulador. *Informativo Abrates*, 25(1):30-38, 2015.

PINHO, R. S. C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. R. C.; OLIVEIRA, M. S.; PIMENTEL, G. C. S.; COSTA, S. A. S. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira**, 33(1):54-60, 2009.

PIROMYOU, P.; BURANABANYAT, B.; TANTASAWAT, P.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil Biology**, 47(1):44–54, 2011.

POZZEBON, B. C.; SANTOS, J. Bactérias endofíticas: Passado, presente e perspectivas visando um futuro sustentável. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 24(1):115-129, 2016.

QIAO, J-Q.; WU, H-J.; HUO, R.; GAO, X-W.; Borriss, R. Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 1(1):12, 2014.

RANGJAROEN, C.; RERKASEM, B.; TEAUMROONG, N.; NOISANGIAM, R.; LUMYONG, S. Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. **Annals of Microbiology**, 65(1):253-266, 2015.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 19(8):827–837, 2006.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, 278(1):1-9, 2008.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BABORSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FRIERE, F. F.; KUKLINSKYSOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-deaçúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, 28(1):142-149, 2012.

SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I-J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *PeerJ*, 5(e3107):1-21, 2017.

SILVA, H. S. A.; TOZZI, J. P. L.; TERRASAN, C. R. F.; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, 63(1):62–67, 2012.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, 5(6):535–544, 2003.

SUN, Y.; CHENG, Z.; GLICK, B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letters**, 296(1):131–136, 2009.

TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEEN, T.; ZAHID, M.; ZAFAR, M. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(2):719–725, 2014.

YOSHIKAWA, M. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, 39(12):1150-1154, 1993.

YUAN, C. L.; MOU, C. X.; WU, W. L.; GUO, Y. B. Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. **Journal of Soils and Sediments**, 11(2):322-329, 2010.

ZAMIOUDIS, C.; MASTRANESTI, P.; DHONUKSHE, P.; BLILOU, I.; PIETERSE, C. M. J. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, 162:304–318, 2013.