UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DA MANCHA (*Xanthomonas vesicatoria*) E DA PINTA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) BACTERIANAS DO TOMATEIRO

JULIANA RESENDE CAMPOS SILVA

2004

JULIANA RESENDE CAMPOS SILVA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DA MANCHA (*Xanthomonas vesicatoria*) E DA PINTA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) BACTERIANAS DO TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de "Mestre"

Orientador
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Silva, Juliana Resende Campos

Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro / Juliana Resende Campos Silva. -- Lavras : UFLA, 2004.

160 p. : il.

Orientador: Ricardo Magela de Souza

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Tomate. 2. Doença bacteriana. 3. Mancha I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.642932

JULIANA RESENDE CAMPOS SILVA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DA MANCHA (*Xanthomonas vesicatoria*) E DA PINTA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) BACTERIANAS DO TOMATEIRO

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

APROVADA em 21 de dezembro de 2004

Drª Rosemeire de Lellis Naves	EMBRAPA/CNPUV
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ao meu pai, Vicente Paulo Campos; minha mãe, Vânia Maria Resende Campos; meu irmão Ricardo e aos demais familiares pelo apoio, incentivo e confiança,

OFEREÇO,

A meu esposo, Luis Henrique Carregal, pelo companheirismo, compreensão e incentivo nas lutas diárias.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força para a realização deste trabalho.

À minha família, pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos, minha eterna gratidão.

Ao meu pai, Vicente Paulo Campos, pelo exemplo de profissionalismo e por todas as palavras de incentivo que sempre me fizeram prosseguir.

À minha mãe, Vânia Resende Campos, por todo o apoio, carinho e força durante toda minha vida.

À minha avó, Zenira, um exemplo de mulher e determinação para a busca da vitória em cada etapa da vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Ao Professor Ricardo Magela de Souza, meu orientador, por essa oportunidade, amizade, apoio e conselhos durante a realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, cujos ensinamentos tornaram possível o meu crescimento profissional.

A Ana Beatriz Zacarone, que me auxiliou na execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Bacteriologia e a Ana Maria, Alessandra, Juliana Barbosa, Patrícia, pela amizade, convivência e auxílio.

Aos demais colegas do Departamento de Fitopatologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo	i
Abstract	ii
Capítulo 1: Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro	1
1 Introdução Geral	2
2 Revisão de Literatura	4
2.1 Mancha e pinta bacteriana do tomateiro	4
2.2 Métodos gerais de controle da pústula e da pinta bacteriana do tomateiro	6
3 Referências bibliográficas	31
Capítulo 2:. Isolamento, caracterização e identificação de espécies bacterianas endofíticas, por análises de ácidos graxos	47
1 Resumo	48
2 Abstract	49
3 Introdução	50
4 Material e métodos	52
4.1 Isolamento de bactérias endofíticas	52
4.2 Identificação bacteriana dos isolados endofíticos por ácidos graxos	53
4.3 Caracterização fisiológica dos isolados endofíticos	55
4.4 Caracterização morfológica dos isolados endofíticos	57
5 Resultados e discussão	58
5.1 Isolamento e identificação de espécies endofíticas por ácidos graxos	58
5.2 Caracterização morfológica e fisiológica dos isolados	

... 63
6 Conclusões... 69
7 Referências bibliográficas... 70
Capítulo 3: Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*, agente da mancha bacteriana do tomateiro... 75
1 Resumo... 76
2 Abstract... 77
3 Introdução... 78
4 Material e métodos... 80
4.1 Seleção de isolados bacterianos endofíticos de haste e folha de tomateiro e pimentão no controle da mancha bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas... 80
4.2 Efeito da inoculação de bactérias endofíticas, anterior e simultaneamente a *Xanthomonas vesicatoria*... 82
4.3 Comparação entre métodos de inoculação de bactérias endofíticas para o controle da mancha bacteriana do tomateiro... 83
4.4 Atividade antagonista *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos à *Xanthomonas vesicatoria*... 85
4.5 Tempo de produção do halo de inibição ao crescimento de Xv por isolados bacterianos endofíticos... 85
5 Resultados e discussão... 86
5.1 Seleção de isolados bacterianos endofíticos de haste e folha de tomateiro e pimentão no controle da mancha bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas... 86
5.2 Efeito da inoculação de bactérias endofíticas, anterior e simultaneamente a *Xanthomonas vesicatoria*... 94
5.3 Comparação entre métodos de inoculação de bactérias endofíticas para o controle da mancha bacteriana do tomateiro... 96

5.4 Atividade antagonística *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos à *Xanthomonas vesicatoria* 98

5.5 Tempo de produção do halo de inibição ao crescimento de Xv por isolados bacterianos endofíticos..... 101

6 Conclusões..... 103

7 Referências bibliográficas..... 104

Capítulo 4: Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* do crescimento de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro 108

1 Resumo..... 109

2 Abstract..... 110

3 Introdução..... 111

4 Material e métodos..... 114

4.1 Seleção em casa de vegetação de bactérias endofíticas para o controle da pinta bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas..... 114

4.2 Atividade antagonística *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*..... 117

5 Resultados e discussão..... 119

5.1 Seleção, em casa de vegetação, de bactérias endofíticas para o controle da pinta bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas..... 119

5.2 Atividade antagonística *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*..... 128

6 Conclusões..... 131

7 Referências bibliográficas..... 132

Capítulo 5: Efeito de bactérias endofíticas, acibenzolar-S-metil, antibiótico e fungicidas na redução da severidade da mancha bacteriana e na produção de tomateiros no campo..... 135

1 Resumo..... 136

2 Abstract..... 137
3 Introdução..... 138
4 Material e métodos..... 140
4.1 Instalação e manejo das plantas empregadas no ensaio..... 140
4.2 Obtenção do inóculo e inoculação das bactérias endofíticas e *Xanthomonas vesicatoria*..... 141
4.3 Montagem do experimento, avaliação dos sintomas e produção..... 143
5 Resultados e discussão..... 145
5.1 Severidade da mancha bacteriana..... 145
5.2 Produção..... 150
6 Conclusões..... 155
7 Referências bibliográficas..... 156

RESUMO

SILVA, Juliana Resende Campos. **Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro.** 2004. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

Cinqüenta e três isolados bacterianos endofíticos foram obtidos a partir de folhas e hastes de tomateiro e pimentão, sendo a maioria gram positivos. O gênero *Bacillus*, com 9 espécies foi o mais abundante, predominando a espécie *B. pumilus*. Em 45 isolados trabalhados, foram identificadas as seguintes espécies, por meio da análise de ácidos graxos: *Acinetobacter johnsonnii, Bacillus amyloliquefaciens, B. cereus, B. megaterium, B. marinus, B. mycoides, B. pumilus, B. sphaericus, B. subtilis, Curtobacterium luteum, Kocuria kristine, Microbacterium liquefaciens, Paenibacillus macerans, Pseudomonas putida e Staphylococcus aureus*. Todos os isolados obtidos foram selecionados em diversos ensaios em casa de vegetação, quanto à eficiência na redução da severidade da mancha e pinta bacteriana do tomateiro. *B. pumilus, B. amyloliquefaciens, B. megaterium*, PIM 11 (espécie não identificada) e *P. gordonae* foram os mais eficazes na redução da severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) (Xv). Já os mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana foram: *Acinetobacter johsonnii, B. pumilus, P. macerans*, PIM 11 (espécie não identificada), *B. sphaericus, B. amyloliquefaciens*, TOM 2 (espécie não identificada), TOM 24 (espécie não identificada) e *Staphylococcus aureus*. Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade de *B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pumilus, B. megaterium* e *A. johnsonnii* em inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum, Pseudomonas syringae* pv *tomato* e de Xv. *P. gordonae*. *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* reduziram a severidade da mancha bacteriana do tomateiro e aumentaram a produção de tomateiros no campo, comparados à testemunha. Tomateiros no campo inoculados com *B. amyloliquefaciens* obtiveram a maior produção. Já as plantas tratadas com ASM, isoladamente ou associado a fungicidas ou bactérias endofíticas, tiveram redução da produção quando comparadas com aquelas que receberam aplicações isoladas.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador) e Edson Ampélio Pozza - UFLA

ABSTRACT

SILVA, Juliana Resende Campos. **Endophytic bacteria control of bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) and bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato.** 2004. 160 p. Dissertation (Master Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Fifty three isolates of endophytic bacteria were obtainned from leaves and stems of tomato and pepper. Most of them were positive gram. The genus *Bacillus* with nine species was the most prevalent, predominating the *B. pumilus*.Among 45 isolates, were identified the following species through fatty acid analyses: *Acinetobacter johnsonnii, Bacillus amyloliquefaciens, B. cereus, B. megaterium, B. marinus, B. mycoides, B. pumilus, B. sphaericus, B. subtilis, Curtobacterium luteum, Kocuria kristine, Microbacterium liquefaciens, Paenibacillus macerans, Pseudomonas putida, Staphylococcus aureus*. All the obtained isolates were screened, in several assays in greenhouse, on the efficiency of reducing the severity of bacterial spot and speck of tomato. *B. pumilus, B. amyloliquefaciens, B. megaterium*, PIM 11 (non identified species) and *P. gordonae* were among the most efficient on reducing the severity of bacterial spot (Xanthomonas vesicatoria) (Xv). But the most efficient on reducing the severity of bacterial speck were: *Acinetobacter johsonnii, B. pumilus, P. macerans*, PIM 11 (non identified species), *B. sphaericus, B. amyloliquefaciens*, TOM 2 (non identified species), TOM 24 (non identified species) and *Staphylococcus aureus*. In vitro studies demonstrated the capacity of *B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pumilus, B. megaterium* and *A. johnsonnii* to inhibit the growth of *Ralstonia solanacearum, Pseudomonas syringae* pv *tomato* and Xv. *P. gordonae, B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus* reduced the severity of bacterial spot and increased yield of tomato in field compared to control. Tomato in field inoculated with *B. amyloliquefaciens* had the highest yield. Plantas treated only with ASM or associated with fungicides or endophytic bacteria had reduced yield when compared to those which received separated applications.

* Guindance Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Edson Ampélio Pozza - UFLA

CAPÍTULO 1

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DA MANCHA (*Xanthomonas vesicatoria*) E DA PINTA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) BACTERIANAS DO TOMATEIRO

1 INTRODUÇÃO GERAL

As bacterioses do tomateiro, mancha e pinta bacterianas causadas por *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) e *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pst) , respectivamente, reduzem a produtividade pela destruição do tecido foliar e pela queda de frutos em formação. Além disso, comprometem a qualidade e o valor comercial dos frutos (Lopes & Santos, 1994). Em relação à mancha bacteriana, perdas significativas ocorrem quando a doença incide nos viveiros, ou quando o ciclo da cultura coincide com períodos chuvosos (Kimura & Carmo, 1996; Moura & Oliveira, 1996). Já a pinta bacteriana tem sido uma das principais doenças sob condições de baixa temperatura e alta umidade, podendo causar perdas de até 30% na produção (Silva & Lopes, 1995). A diagnose no campo é facilitada pela sintomatologia específica para cada uma delas (Lopes & Quezado-Soares, 1997; Jones, 1993; Robbs, 1985).

No controle dessas doenças bacterianas existem poucos produtos químicos disponíveis para pulverização. Nesse caso, são usados apenas alguns poucos antibióticos, além de outros produtos de ação bactericida ou de indução de resistência. Contudo, a tendência, na agricultura atual, é utilizarem-se produtos de baixa toxicidade. Uma nova opção no controle de fitobactérias tem sido o biológico, o qual vem recebendo bastante atenção por se tratar de um método natural, que ocorre com freqüência na natureza sem causar impactos ao meio ambiente e nem efeitos toxicológicos, surgindo como importante método de controle.

Alguns trabalhos têm sido feitos com bactérias endofíticas, as quais têm se mostrado agentes eficientes de controle em patossistemas como *X. campestris pv oryzae* em arroz, *X. campestris pv citri* em citros, *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* e *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* em batata, *X.*

campestris pv campestris em repolho e *Ralstonia solanacearum* em tomate (van Buren et al., 1993; Assis et al., 1998; Sturtz & Matheson, 1996; Barreti, 2001). Segundo relatos de Colin & Chafik (1986), aplicações semanais de suspensão de células de dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* controlaram *Pst* em tomate com igual eficiência ao tratamento com fungicidas cúpricos. Foi observada ainda a ocorrência de leve efeito residual, o que pode ser explicado pela capacidade das bactérias de manter população epifítica residual nas folhas de tomate.

Campos et al. (2002) conseguiram controle da mancha bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas com 5 isolados de bactérias endofíticas. Dois isolados controlaram também a pinta bacteriana e promoveram o crescimento das plantas (Campos et al., 2002), sendo considerados promissores para o controle de ambas as bacterioses do tomateiro. Carrer Filho et al. (2002) e Halfeld-Veira et al. (2002) obtiveram controle eficiente dessas bacterioses do tomateiro com a utilização de um isolado de actinomiceto (RD-01), em casa de vegetação e com a utilização do isolado bacteriano UFV-IEA6 do filoplano. Silva et al. (2001) obtiveram alguns isolados de rizobactérias com aparente atividade de indução de resistência sistêmica à *Pst*, dada a separação espacial entre os antagonistas e o patógeno. Halfeld-Vieira et al. (2001) conseguiram bom controle da pinta bacteriana com 3 isolados de bactérias do filoplano do tomateiro.

Como são escassas as pesquisas relativas ao controle biológico da mancha e pinta bacteriana do tomateiro, a busca por isolados bacterianos endofíticos continua, com o objetivo de se obter agentes potenciais eficazes no controle dessas enfermidades. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, isolar, identificar e testar o efeito de isolados endofíticos no controle da mancha e da pinta bacteriana do tomateiro, em casa de vegetação e em campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mancha e pinta bacterianas do tomateiro

O número de bacterioses de plantas é relativamente pequeno em relação às doenças causadas por fungos e por vírus. Esta proporção, entretanto, é diferente quando se comparam as perdas provocadas por este grupo de patógenos. A mancha e a pinta bacteriana causadas por *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) (ex Doidge 1920) Vauterin et al. (1995) (= *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*) e pela *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pst) (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie (1978), respectivamente, são doenças economicamente importantes para o tomateiro, em condições ambiente propícias para a infecção, exigindo medidas de controle em áreas infestadas (Lopes, 2001).

A mancha, ou pústula bacteriana, foi observada pela primeira vez no Brasil em 1951 (Kimura & Carmo, 1996). Atualmente, é considerada uma das doenças bacterianas mais difundidas no país, sendo encontrada praticamente em todas as regiões produtoras de tomate. No Brasil, não existem informações dos prejuízos advindos desta doença, porém, têm-se observado, freqüentemente, perdas significativas quando ela incide em viveiros ou quando o ciclo da cultura coincide com períodos chuvosos (Kimura & Carmo, 1996; Moura & Oliveira, 1996). A pinta bacteriana foi descrita no Brasil por volta de 1959 (Tokeshi & Carvalho, 1980). Atualmente, tem sido uma das principais doenças sob condições de baixa temperatura e alta umidade, podendo causar perdas na produção de até 30% (Silva & Lopes, 1995).

A disseminação dessas bactérias pode ser por meio de sementes, sendo esta a forma de disseminação a longas distâncias e a principal fonte de inoculo primário. Na cultura, o patógeno pode ser disseminado por respingos de chuva e pela água de irrigação, maquinarias e práticas de manejo usuais em viveiros, como desbaste e repicagem, especialmente quando a folhagem está úmida. Estas bactérias podem sobreviver em restos de cultura e como residentes na rizosfera, o que assegura a sua permanência no campo, mesmo na ausência da cultura, constituindo também outra forma de inoculo primário (Jones, 1993). A penetração dessas bactérias no tecido hospedeiro se dá pelos estômatos, hidatódios e ferimentos ocasionados pelos tratos culturais (Moura & Oliveira, 1996). O processo de infecção da mancha bacteriana em tomate é favorecido pela presença de umidade elevada (95%-100%) e temperaturas entre 22°C e 32°C (Kimura & Carmo, 1996), enquanto que a pinta bacteriana é favorecida por temperaturas mais amenas (abaixo de 24°C) (Moura & Oliveira, 1996).

A sintomatologia dessas bacterioses constitui importante método diagnóstico. A mancha bacteriana ataca todos os órgãos da parte aérea da planta. No tomateiro, não provoca queda das folhas, mas causa manchas encharcadas, de formato e tamanho pouco definidos, que se tornam amarronzadas quando os tecidos ficam necrosados e, coalescidas, promovem secamento da folhagem a partir das folhas baixeiras da planta. O ataque durante a floração causa queda de flores, resultando na redução da produção. Nos frutos, as lesões ocorrem em qualquer ponto, inicialmente apresentando-se como pequenas manchas úmido-aquosas e escuras. Com o desenvolvimento da doença, as lesões aumentam em tamanho, os bordos se tornam ligeiramente elevados e a superficie corticosa, irregular e com centro deprimido. Com a destruição da folhagem, é comum aparecerem sintomas de queimadura de sol nos frutos, principalmente em tomate para processamento industrial (Lopes & Quezado-Soares, 1997).

Os sintomas da pinta bacteriana são caracterizados por lesões circulares nos folíolos de coloração marrom-escura à negra, apresentando halo amarelado estreito nos estádios mais avançados. As manchas podem coalescer tomando grandes áreas (Jones, 1993). Os sintomas mais característicos aparecem nos frutos ainda verdes, sob forma de pequenas manchas pretas, facilmente destacáveis da casca por serem ligeiramente elevadas (Robbs, 1985). Nos caules, pecíolos, pedúnculos, pedicelos e sépalas, as lesões podem se apresentar alongadas, mas sempre de coloração escura (Lopes & Santos, 1994).

Grande variabilidade em termos de patogenicidade em hospedeiros ocorre nas espécies de *Xanthomonas* e em *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas syringae* ataca diversos hospedeiros (Gitaitis & Jones, 1992). No tomate recebe o nome de *P. syringae* pv *tomato*.

2.2 Métodos gerais de controle da pústula e da pinta bacterianas do tomateiro

O progresso de doenças bacterianas de parte aérea apresenta algumas particularidades distintas em relação às doenças fúngicas. As bactérias podem se desenvolver como residentes em folhas de plantas hospedeiras e se multiplicar sob condições de baixa umidade ou ambiente desfavorável, porém sem causar sintomas aparentes da doença. As epidemias só ocorrem quando as condições do ambiente tornam-se favoráveis (Bashan et al., 1982).

A redução dos prejuízos causados envolverá sempre a aplicação de reais métodos de controle, dentro do conceito de manejo integrado (Lopes, 2001). No caso das enfermidades pinta e mancha bacteriana do tomateiro, os métodos de controle podem ser agrupados em: 1) controle cultural, 2) resistência genética, 3) controle químico e 4) controle biológico.

2.2.1 Medidas de controle cultural

As medidas de controle cultural visam basicamente evitar a entrada do patógeno na área e, quando já presente, impedir que ele encontre condições favoráveis de infecção, multiplicação e disseminação. Essas medidas podem ser auxiliares ou fundamentais, ou mesmo imprescindíveis ao controle dessas fitobacterioses (Lopes, 2000).

2.2.1.1 Tratamento de sementes e uso de mudas sadias

Como tratam-se de bacterioses transmitidas por sementes, uma das medidas mais eficientes para seus controles é a redução ou eliminação do inóculo inicial veiculado pelas sementes e mudas, nas quais as bactérias sobrevivem protegidas durante o período inadequado a epifitias (doenças), além de constituir em inóculo para as plântulas e serem disseminadas a longas distâncias (Lopes & Quezado-Soares, 2000). Dados obtidos por McCarter et al. (1983) sugerem que sementes e plantas daninhas hospedeiras são, provavelmente, fontes de inóculo primário de Pst em tomateiros no campo. A sobrevivência de Pst, tanto no solo como em restos culturais, é quase improvável em condições de temperaturas elevadas do solo, como as do Sul da Geórgia (EUA), mas é possível ocorrer quando em temperaturas mais baixas.

A transmissão eficiente do patógeno por sementes permite que estirpes mais virulentas e cada vez mais resistentes a antibióticos sejam disseminadas a longas distâncias. Assim, é necessário o uso de sementes sadias ou com níveis bem próximos de zero, uma vez tratarem-se de doenças tipicamente policíclicas,

capazes de compensar rapidamente pequenas reduções na quantidade inicial de inóculo, quando as condições são favoráveis. É ainda importante ressaltar que, em sementeiras e ou viveiros, efetuam-se desbastes, repicagens e irrigações freqüentes, práticas estas extremamente eficientes em promover a disseminação da mancha e pinta bacteriana, especialmente quando a folhagem está úmida (Pohronezny et al., 1990). Assim, ocorre a formação de focos secundários bem no início das epidemias em viveiros estabelecidos com sementes contaminadas.

Entre os métodos de tratamento de sementes descritos na literatura, a termoterapia é um dos mais citados para a erradicação de fitobactérias localizadas interna ou externamente às sementes (Zambolim et al., 1997). Assim, as sementes suspeitas de contaminação por Xv e Pst podem ser tratadas pela imersão em água quente a 50°C/20min e 48-50°C/60min, respectivamente. No caso da Pst do tomateiro, não há erradicação total do patógeno, havendo a necessidade de um tratamento adicional com estreptomicina antes do plantio. Também pode-se realizar a imersão em ácido clorídrico a 5%/5h (Maringoni et al, 1994) ou em hipoclorito de sódio a 1,1% de cloro ativo/15minutos. O tratamento térmico também pode ser realizado via calor seco, em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 70°C por 96h para sementes de tomate (Silva et al., 2002) no controle da Xv.

2.2.1.2 Manejo da água

Para as bactérias causadoras de lesões foliares, como Pst e Xv, a alta umidade relativa e a presença de água livre são essenciais para a penetração e infecção. Isso proque estas condições afetam a abertura e o fechamento dos estômatos, promovem a congestão de água nas câmaras subestomáticas, a exsudação bacteriana, a sobrevivência das células bacterianas na superfície das

folhas, a formação de fluido intercelular e a subseqüente dispersão das bactérias pelos tecidos (Goto, 1992). Além disso, a água livre também favorece a infecção secundária em plantas sadias sob condições de campo (Diab et al., 1982). Por outro lado, longos períodos de baixa umidade relativa, pouca chuva e estações secas, especialmente quando acompanhadas de alta temperatura, retardam o desenvolvimento da doença (Rotem, 1981). Esses fatores ambientais, dentro do ciclo de vida dessas bacterias, vão afetar o processo de multiplicação e disseminação.

Diab et al. (1982) observaram que períodos curtos de alta umidade relativa após a irrigação por aspersão ou chuva podem ser suficientes para que ocorra a penetração da Xv em pimentão. Uma vez no interior do tecido, a baixa umidade relativa do ar, como observado em Israel, não previne o desenvolvimento da doença. Portanto, tais fatores ambientais são essenciais ao sucesso na penetração do patógeno. O ataque da Xv no pimentão é mais severo em campos com irrigação por aspersão do que por gotejamento. Assim, caso não seja possível a substituição do método de irrigação por aspersão para o gotejamento, recomenda-se aumentar a lâmina de água e reduzir a freqüência de aplicação.

Portanto, o manejo da água afetará sempre uma ou mais fases do ciclo das relações Xv e Pst nos seus hospedeiros.

2.2.1.3 Rotação de culturas

Este método evita a sobrevivência do patógeno no solo diminuindo ou eliminando o inóculo inicial, essencial aos novos ciclos da doença na plantação recentemente implementada. Segundo Lopes & Quezado-Soares (2000), o

plantio de gramíneas na área em rotação possibilitou o cultivo posterior do tomate sem a incidência da Xv ou Pst. Contudo, o plantio de tomate, ou o desenvolvimento de plantas daninhas da família Solanaceae na área em rotação possibilitou a manutenção do inoculo da Xv e Pst em populações epifíticas na folhagem para o próximo plantio.

Embora a área submetida à rotação possa estar livre de bacterioses, plantações adjacentes podem estar infectadas e reintroduzi-las na área. A disseminação da Pst e Xv de plantas mais velhas para as mais novas ocorre em plantios sucessivos de tomate em áreas próximas da submetida à rotação promovendo a reinfestação (Lopes & Quezado-Soares, 2000).

2.2.1.4 Tratos culturais

Como desbrotas, amarrios e pulverizações são comuns em hortaliças e conduzem a ferimentos na planta, constituindo portas de entrada dessas bactérias. Pohronezny et al. (1990) demonstraram que Xv pode ser transmitida realmente de planta para planta nos campos de tomate durante as operações rotineiras de desbaste. Assim, estudando métodos para diminuir tal disseminação, esses autores observaram redução drástica da incidência da mancha bacteriana quando providone-iodine ou etanol 70% foram utilizados na lavagem das mãos dos trabalhadores rurais envolvidos nessas operações e que o potencial de dispersão da mancha bacteriana foi aumentado grandemente quando a desbrota foi realizada em plantas úmidas. Recomendou-se, portanto, esperar a diminuição da umidade na superficie das plantas antes das operações rotineiras de desbrota e amarrio. Os autores observaram também que a incidência desta doença foi significativamente menor quando o desbaste foi evitado. Assim, um método preciso de plantio de uma ou duas sementes por cova assegurou um

stand ideal eliminando a necessidade do desbaste. Em adição, Getz et al. (1983) observaram que pequenos ferimentos, como aqueles ocasionados pela quebra de tricomas durante a desbrota, são importantes portas de entrada do patógeno.

No campo, o simples ordenamento dos trabalhos, como iniciar os tratos culturais pelo talhão sadio seguindo-se pelo infectado, atrasa ou mesmo evita a disseminação da doença para as plantas sadias (Pohronezny et al., 1990).

Outra forma de disseminação dessas bacterioses seria por meio de ventos fortes, os quais promovem injúrias nas folhas e demais órgãos das plantas pela agitação e atrito constantes e favorecendo a abrasão desses pelas partículas de solo e areia carreadas pelo vento (Pohronezny et al., 1992), além de transportar gotículas de água contendo células bacterianas. Os microferimentos causados são vias potencias de infecção, quando associados à água livre, sendo comum a ocorrência de epidemias bacterianas severas, poucos dias após chuvas acompanhadas por fortes ventos (Goto, 1992).

Em resumo, medidas fitossanitárias, como uso de sementes tratadas e plântulas sadias, irrigação por gotejamento (Moss et al., 1987) e redução da disseminação mecânica destas fitobactérias durante o desbaste e outras operações manuais, usadas em conjunto, minimizam a severidade das doenças causadas por Pst e Xv ou até mesmo sua introdução no campo de plantio.

2.2.2 Resistência genética

O plantio de cultivar resistente constitui o método mais econômico para se controlar Pst e Xv em tomate. No caso da pinta bacteriana do tomateiro, a resistência é total, do tipo monogênica, conferida por um único par de gene denominado Pto, fazendo com que o produtor não tenha que se preocupar com

nenhuma outra forma de controle. A resistência conferida por este gene tem se mostrado estável. Silva & Lopes (1993), citados por Lopes (2000), realizaram levantamentos com 189 isolados de Pst e observaram que não houve quebra de resistência. Para a mancha bacteriana em tomateiro, a resistência máxima até hoje conseguida tem sido apenas parcial, portanto, somente auxiliar, requerendo medidas de controle adicionais (Lopes, 2000).

No Brasil não existem cultivares de tomate, híbridas ou não, com alto nível de resistência à mancha bacteriana. As cultivares brasileiras para processamento industrial Agrocica 30, Agrocica 7 e Agrocica 8 apresentaram o menor nível de doenças em São Paulo. Dentre as cultivares de tomate de mesa nenhuma delas pode ser considerada resistente (Baldini & Kurozawa, 1990).

2.2.3 Controle Químico

Em geral são feitas pulverizações ou tratamento de material propagativo com antibióticos ou com fungicidas à base de cobre visando retardar ou erradicar infecções. O êxito ou fracasso desse controle estará em função da eficácia dos princípios ativos ou de doses aplicadas, cuidados na aplicação, épocas de tratamento e, principalmente, à sensibilidade ou resistência das populações do patógeno aos produtos empregados (Kimura & Carmo, 1996).

Marco & Stall (1983) observaram a ineficácia do cobre no controle da mancha bacteriana do tomateiro e relataram, pela primeira vez, a resistência dessa bactéria a esse bactericida. Silva & Lopes (1995) constataram a presença de populações resistentes de *Pst* em campos de tomate para processamento industrial, pulverizado ou não com fungicidas cúpricos.

Pernezny & Collins (1997) concluíram que certas áreas, como gemas e flores, funcionam como reservatórios de inóculo por apresentarem ambiente mais úmido, garantindo sua multiplicação e protegerem as células bacterianas de altos níveis de luz ultravioleta e, principalmente, das doses letais dos bactericidas aplicados. Dessa forma, células bacterianas escapam da ação danosa de químicos e de radiações e atuam como inóculo potencial, pronto para iniciar a doença, quando ocorrerem condições propícias. Outro fator freqüentemente citado como responsável pela baixa eficiência no controle com produtos à base de cobre é a ocorrência de estirpes resistentes ao produto. Aguiar et al. (2000) constataram, em cultivos de tomate em vários municípios do Rio de Janeiro, isolados de Xv resistentes a doses de 28 até 1800 mg/ml de Cu^{++}. Silva & Lopes (1995) não obtiveram controle químico efetivo de uma estirpe de *Pst* resistente ao cobre afetando o tomateiro. Assim, Carmo et al. (2001) confirmaram ser bastante variável e, na maioria das vezes, não eficiente, o controle químico da mancha bacteriana do tomateiro utilizando-se fungicidas cúpricos.

Goto et al. (1993) relataram sobrevivência de fitobactérias superior em folhas apresentando injúrias. Muito provavelmente, tal fato se deve ao aumento de sítios de infecção pela bactéria, uma vez que injúrias têm papel importante na epidemiologia da doença (Carmo et al., 1996a; 1996b). Por outro lado, chuvas freqüentes e irrigações por aspersão contribuem para a lavagem de resíduos dos produtos, reduzindo sua concentração, ao mesmo tempo em que ocorrem condições propícias à infecção (Carmo et al., 2001).

As possíveis causas da inconstância da eficiência do controle químico com oxicloreto de cobre podem ser devido a fatores como: desenvolvimento de variantes resistentes ao longo do período de pulverizações provocado pela repetida lavagem do produto e exposição a subdosagens; local de aplicação do produto e, conseqüentemente, maior ou menor lavagem; a própria lavagem do produto pelas chuvas ou irrigações, mais intensas exatamente nos períodos mais

propícios a epidemias, quando ocorre maior disseminação do patógeno e aumento de sua multiplicação (Carmo et al., 2001).

Xanthomonas vesicatoria pode adquirir resistência a antibióticos. O'Garro (1998) encontrou 62% dos isolados obtidos em São Cristofer e Grenada e 62,8% a 83,6% daqueles de Antigua e Santa Lúcia no Caribe resistentes à estreptomicina.

Os estudos de controle químico da pinta bacteriana são recentes. De acordo com Jardine & Stephens (1987a,b), estreptomicina forneceu controle significativo da pinta bacteriana, reduzindo em 39% a doença, quando aplicada 24 a 48 horas antes da inoculação, em casa de vegetação, enquanto oxitetraciclina reduziu em 25%. Entretanto, o nível da doença ainda foi elevado, não apresentando assim um controle eficiente. Estes mesmos autores indicam que a eficácia dos fungicidas cúpricos e dos antibióticos está relacionada às condições ambientais, só havendo proteção significativa quando essas condições não são favoráveis ao desenvolvimento da doença.

Conlin & McCarter (1983) e Marco & Stall (1983) relataram que mesmo isolados de bactérias sensíveis ao cobre não são eficazmente controlados com pulverizações cúpricas. Isso ocorre devido ao fato dos íons de cobre poderem se ligar a muitas substâncias orgânicas na superfície das plantas, tornando-se não tóxico às bactérias nesta forma (Menkissoglu & Lindow, 1988).

Silva & Lopes (1995) observaram alta população epifítica de Pst em cultivares suscetíveis, mesmo quando estas receberam tratamento químico, com produtos à base de cobre e ou antibióticos. Entretanto, mesmo em baixas populações e não causando doença na cultivar resistente, a população epifítica presente nesta cultivar pode funcionar como inóculo primário para campos de cultivares suscetíveis mais novos, em áreas circunvizinhas, provocando início da epidemia sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença.

Atenção especial deve ser dada à pesquisa com produtos químicos, em busca de novos produtos, ou planejamento de aplicações dos mesmos, visto que antibióticos e fungicidas cúpricos não estão sendo eficazes no controle de populações epifíticas das bactérias em questão e nem na doença já estabelecida. Pequeno retorno ao investimento sobre o controle da mancha bacteriana com fungicidas protetores tem sido conseguido (Pernezny et al., 1996). Assim, medidas de caráter preventivo, como o uso de sementes sadias ou submetidas a tratamentos eficientes associado a práticas como rotação com gramíneas e plantio distantes de lavouras mais velhas, além do manejo adequado de irrigação, complementadas com pulverizações com cúpricos, são, hoje, as mais adequadas ao controle da Xv e Pst do tomate e pimentão (Lopes et al., 1994).

2.2.4 Controle biológico

As bactérias envolvidas no controle biológico podem ou não associar-se às plantas e agem de diversas formas.

2.2.4.1 Indução de resistência como medida de controle de fitobacterioses

A indução de resistência torna-se uma ferramenta fundamental para o manejo de doenças, pois os indutores podem ser usados em programas de aplicação de defensivos agrícolas visando à redução no número de aplicações e ou na dosagem destes.

A indução de proteção de plantas contra vários patógenos por agentes bióticos e abióticos é relatada desde a década de 1930, quando Chester (1933) propôs o termo *acquired physiological immunity* (imunidade fisiológica adquirida). Desde então, vários termos têm sido utilizados para descrever o fenômeno de indução de resistência tais como *systemic acquired resistance*

(resistência sistêmica adquirida – SAR) (Ross, 1961), *translocated resistance* (resistência translocável) (Hurbert & Helton, 1967) e *plant immunization* (imunização de plantas) (Tuzun & Kuc, 1991).

A resistência induzida é definida como o aumento da capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de patógenos que é adquirida depois de uma estimulação, pois o resultado da resistência deve-se a um agente indutor que está presente antes da infecção e é chamado de *induced systemic resistance* (ISR) ou *systemic acquired resistance* (SAR) (Hammerschmidt & Kuc, 1995).

A resistência induzida pode ser ativada por meio do tratamento com agentes bióticos (microrganismos viáveis ou inativos) ou abióticos (agentes químicos) (van Loon et al., 1998a), no qual os mecanismos de defesa são ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais distantes, de forma mais ou menos generalizada (Sticher et al., 1997).

Em trabalhos publicados antes de 2001, ISR e SAR foram considerados fenômenos distintos devido à indução e desencadeamento destes mecanismos. Entretanto, os resultados fenotípicos finais são os mesmos, indução de resistência sistêmica. Pieterse et al. (1998) e van Loon (1997) relataram que SAR envolve o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP s) como mecanismo de defesa da planta, sendo sua indução dependente do ácido salicílico (AS). Neste caso, a indução de resistência pode resultar em alterações visuais, como reação de hipersensibilidade (HR) na planta que sofreu indução, podendo ainda ser obtida por meio do tratamento com elicitores bióticos ou abióticos.

No caso de ISR, alterações visuais não são perceptíveis, o agente indutor é um não patógeno e a indução de defesa não é dependente do AS, havendo uma outra rota de sinalização mais associada a jasmonatos e etileno. Entretanto, a partir do Simpósio em Corfu, 2000 (Hammerschmidt et al., 2001), ficou estabelecido que estes processos são complementares, não podendo ser mais

considerados distintos, sendo, portanto, denominados de indução de resistência. Chegou-se a esta conclusão pois as rotas metabólicas destes processos são complementares, ou seja, intercruzam-se, devido a várias evidências. Por exemplo, o gene NPR1 é comum às duas rotas.

Assim, quando as plantas são expostas a estes agentes ficam protegidas contra patógenos, entretanto, não se pode assumir simplesmente que ocorreu indução de resistência. Afinal, o agente de controle tanto pode estar realmente induzindo resistência como atuando diretamente sobre o patógeno ou até ocorrendo as duas coisas ao mesmo tempo (van Loon et al., 1998a; 1998b).

Steiner & Schonbeck (1995), citados por van Loon et al. (1998a), propuseram critérios básicos para investigar se a resistência exibida pela planta foi realmente induzida ou se ela é devida a outros fatores que, de alguma forma, contribuíram para reduzir a incidência e ou severidade da doença. São eles:

1 supressão da resistência induzida pela exposição prévia da planta a substâncias que inibem a expressão de genes do hospedeiro;

2 necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência;

3 não haver uma relação entre a magnitude da resistência expressa e quantidade crescente do indutor aplicado à semelhança do que se observa em casos típicos de uso de defensivos;

4 inespecificidade da proteção;

5 a resistência ser local e sistêmica;

6 ser dependente do genótipo da planta.

A indução de resistência sistêmica por rizobactéria é chamada de ISR, enquanto aquela induzida por outro tipo de agente é chamada SAR (Van Loon et al., 1998a; 1998b). SAR é expressa ao nível máximo quando o organismo indutor causa necrose (Cameron et al., 1994) enquanto que ISR expressa por

PGPR (*plant growth promotion rizobacteria* – rizobactérias promotoras do crescimento de plantas) tipicamente não causa nenhum sintoma necrótico na planta hospedeira (Van Loon et al., 1998a; 1998b). Tanto SAR quanto ISR são mecanismos de resistência latente expressos por meio de uma inoculação subsequente ou pela inoculação do patógeno desafiador (Van Loon, 1997).

Agentes abióticos de SAR são ácido salicílico (AS), etileno, ácido dicloro-isonicotínico e benzimidazóis (Gorlach et al., 1996; Sticher et al., 1997). Geralmente, a duração da proteção é menor utilizando-se patógenos do que PGPR, através da via ISR, além do quê, uma inoculação prévia do patógeno pode se tornar fonte de inóculo secundário (Wei et al., 1991). Já o patógeno avirulento talvez possa diminuir ou não ativar a expressão de SAR durante a infecção (Heath, 1982).

2.2.4.2 Bactérias endofíticas

A teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti (1926), citado por Hallmann et al. (1997a). A partir de 1940, surgiram trabalhos com bactérias endofíticas em vários tecidos de plantas, incluindo sementes e óvulos (Mundt & Hinkle 1976), tubérculos (Trevet & Hllis, 1948), raízes (Philipson &Balir 1957), hastes, folhas e frutos (Samish et al., 1961; Sharrock et al., 1991).

Bactérias isoladas dos tecidos internos de plantas sadias compreendem mais de 129 espécies, representando mais de 54 gêneros (Gardner et al., 1982; Hallmann et al., 1997b; Mahaffee & Kloopper 1997a; McInroy & Kloopper 1995b; Mundt & Hinkel 1976; Sturz 1995), dos quais *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* os mais comuns. As primeiras pesquisas relataram as bactérias endofíticas como contaminantes resultantes de desinfestação incompleta da superfície vegetal ou patógenos latentes (Hollis

1949; Smith 1911; Thomas & Graham 1952, citados por Hallmann et al., 1997a). Entretanto, pesquisas recentes têm demonstrado que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e reduzir sintomas de doenças causadas por vários patógenos (Chen et al., 1995; Frommel et al., 1991; Klopper et al., 1992; Pleban et al., 1995; Van Peer & Schippers 1989).

Há diversas definições para o termo endofítico, incluindo, em geral, fungos e bactérias (Chanway, 1996). Conceitualmente, bactérias endofíticas têm sido definidas por Kado (1992) como bactérias que residem dentro dos tecido das plantas sem causar dano ou benefício, garantindo apenas residência. Entretanto, esta definição é considerada muito restrita, pois exclui a possibilidade destas bactérias desenvolverem relações simbiontes com seu hospedeiro (Hallmann et al., 1997a). Quiespel (1992) considera endofíticas somente as bactérias que estabelecem endossimbiose com a planta, em que a planta recebe um benefício ecológico pela presença do simbionte, bem como aumento da tolerância ao estresse ou promoção do crescimento. Entretanto, esta definição também é restrita, pois somente aquelas bactérias que conferem benefício à planta seriam consideradas endofíticas, excluindo-se assim as de efeito neutro ou desprezível. Por outro lado, Hallmann et al. (1997a) consideram como bactérias endofíticas aquelas que podem ser isoladas de um tecido de planta desinfestado superficialmente ou extraída de dentro da planta. Esta definição inclui bactérias que colonizam os tecidos internos com aparente efeito neutro, bem como as simbiontes. Além disso, inclui as bactérias que, durante sua fase endofítica, flutuam entre a colonização endofítica e epifítica.

A metodologia para o isolamento de bactérias endofíticas é importante e baseia-se nas definições propostas para o termo endofítico. Teoricamente, um procedimento de isolamento deve recuperar a população total interna da planta. Entretanto, a desinfestação superficial incompleta do material vegetal, a adsorção de células bacterianas às estruturas, ou a penetração do produto

esterilizante nos tecidos resultam em perda de alguns endofíticos (Hallmann et al., 1997a). Assim, várias técnicas têm sido empregadas para o isolamento de bactérias endofíticas, tais como trituração de tecidos desinfestados superficialmente, extração pelos métodos de pressão, vácuo e centrifugação.

A decisão sobre o método de isolamento a ser utilizado deve basear-se em objetivos específicos, os quais serão influenciados por critérios tais como nicho ecológico de interesse e fatores dependentes da planta (espécie, idade e tecido), bem como a viabilidade da fonte e o número total de amostras a serem processadas. A aplicação e comparação das diferentes técnicas oferecem vantagens e desvantagens. Assim o pesquisador deve selecionar a técnica específica que melhor se adapte aos objetivos da pesquisa em questão. Conseqüentemente, possibilitará um estudo da colonização e localização de diferentes perspectivas, facilitando o entendimento da função potencial da bactéria endofítica no hospedeiro (Hallmann et al., 1997a).

A capacidade da bactéria de colonizar os tecido internos das plantas pode conferir vantagem ecológica sobre as bactérias que podem somente colonizar as plantas epifiticamente. Os tecidos internos das plantas promovem maior uniformidade e proteção ambiental aos microrganismos do que a superfície das plantas, onde estão expostos a condições ambientais extremas. Assim alguns fatores que limitam a sobrevivênvia da bactéria por um longo período seriam a temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana.

Pergunta sempre surge no limiar de um projeto de pesquisa. Qual seria a origem das bactérias endofíticas e como elas penetram nos tecidos das plantas? Bactérias endofíticas parecem originar-se de sementes (Adams & Kloepper 1996; McInroy & Klopper 1995a; Misaghi & Donndelinger 1990; Mundt & Hinkle 1976; Pleban et al., 1995), material vegetativo (Dong et al., 1994; Sturz 1995), solo da rizosfera e filoplano (Hallmann et al., 1997b; Patriquin et al.,

1983). As bactérias transmitidas por sementes já estão presentes nas plantas. Bactérias endofíticas potenciais podem, primeiro colonizar a superfície das raízes antes de entrarem na planta e encontram seu hospedeiro por quimiotaxia, eletrotaxia ou acidentalmente (Hallmann et al., 1997a).

Em geral, a entrada de bactéria nos tecidos das plantas pode ser via estômatos, lenticelas, ferimentos (incluindo tricomas quebrados), áreas de emergência de raízes laterais e de radicelas (Huang 1986). Entretanto, a principal via de entrada de bactérias endofíticas parecem os ferimentos que naturalmente ocorrem como resultado do crescimento da planta ou através de pêlos radiculares e conjunções epidérmicas (Sprent & de Faria, 1988). Ferimentos nas plantas em geral, induzidos por fatores bióticos, como fungos, fitonematóides, insetos, ou fatores abióticos, como aração, flutuações de temperaturas extremas, enxertia, podas de raízes, estão presentes em todos os agroecossitemas e são, provavelmente, os principais fatores para a penetração de bactérias (Hallmann et al., 1997a).

Estas bactérias, uma vez no interior das plantas, se mantêm localizadas em tecidos específicos, como córtex da raiz ou sistemicamente, pelo transporte através dos vasos condutores ou apoplasticamente (Hurek et al., 1994; James et al., 1994; Mahaffee et al., 1997b; Quandt-Hallmann et al., 1997; Patriquin & Dobereiner, 1978). Uma vez estabelecidas no interior da planta, elas podem ser transmitidas vegetativamente, tal como ocorreu com *Acetobacter dizotrophicus* por dois cortes sucessivos em cana-de-açúcar (Dong et al., 1994).

Geralmente, as bactérias endofíticas localizam-se nos espaços intercelulares (Dong & tal., 1994; Hinton & Bacon 1995; Quadt-Hallmann & Klopper 1996; Mahaffee et al., 1997b; Patriquin & Dobereiner 1978; Reinhold & Hurek, 1988), com apenas algumas pesquisas demonstrando a colonização intracelular (Frommel et al., 1991; Mahaffee et al., 1997b; Quadt-Hallmann & Klopper, 1996). Já a colonização bacteriana no sistema vascular tem sido

amplamente pesquisada (Bell et al., 1995; Lamb et al., 1996; Mahaffee et al., 1997b); entretanto, não se sabe ainda se o sistema vascular serve apenas como meio de transporte para a bactéria endofítica ou se ela realmente se multiplica no seu interior. Assim o crescimento e o estabelecimento das bactérias endofíticas no interior dos tecidos das plantas requerem nutrientes e Foster et al. (1983), sugerem que estas bactérias utilizam exsudatos encontrados nos espaços intercelulares em vez de degradar materiais mais complexos da parede celular.

2.2.4.3 Controle biológico com bactérias endofíticas

A dificuldade em encontrar medidas efetivas de controle para algumas doenças de plantas e o uso intensivo de produtos químicos fazem do controle biológico uma alternativa real na busca de uma boa produtividade na agricultura, uma vez que as doenças são responsáveis por perdas econômicas consideráveis às culturas de importância agrícola. A amenização dos problemas causados pela contaminação por agrotóxicos, resultando em produtos mais sadios, com economia e menores riscos ao ambiente, é uma exigência cada vez maior dos consumidores.

As bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante aos patógenos de plantas, portanto, tornam-se candidatas potenciais a agentes de controle biológico. Assim, alguns mecanismos de antagonismo, como a antibiose pela produção de substâncias antimicrobianas, parasitismo direto, competição por nutrientes e por nichos ecológicos e a indução de resistência, estão envolvidos (Chen et al., 1996; Goel et al., 1999).

Muitas vezes ocorre o controle biológico clássico por antagonismo direto exercido por tais bactérias contra o fitopatógeno (Tuzun & Klopper, 1995). Mas, há situações em que antibiose e antagonismo apenas não explicam o controle biológico exercido (van Loon et al., 1998b). Atualmente, sabe-se que

quando tais bactérias colonizam o sistema radicular, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas atuam como elicitadores de sinais bioquímicos, provavelmente jasminatos ou etileno (Pieterse et al., 2001; van Loon et al., 1998a; Ton et al., 2001). Este sinal transloca-se até sítios distantes do local de sua gênese e atuam em genes que codificam para a síntese de componentes da resistência, os quais são ativados e, então, expressam a reação do hospedeiro (van Loon et al., 1998a; Sticher et al., 1997).

A atividade antagonística de bactérias endofíticas contra bactérias fitopatogênicas tem sido estudada. Van Buren et al. (1993) observaram redução dos sintomas da podridão anelar da batateira causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*, utilizando isolados de bactérias endofíticas Além disso, *Pseudomonas flourescens* 89B-27 e *Serratia marcescens* 90-166 foram observadas como indutoras de resistência em pepino a *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, bem como a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerium* e *Colletrotrichum orbiculare* (Liu et al., 1995a, 1995b, 1995c).

Colin & Chafik (1986) relataram que aplicações semanais de suspensão de células de dois isolados de *P. fluorescens* controlaram *Pst* com igual eficiência ao tratamento com compostos cúpricos. Ocorreu ainda um leve efeito residual em função da capacidade das bactérias de manter população epifítica residual nas folhas de tomate. Nascimento (1998) observou, em casa de vegetação, redução significativa na incidência de *Ralstonia solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro, com a utilização de bactérias endofíticas. Campos et al. (2002) obtiveram um bom controle da mancha bacteriana e promoção do crescimento das plantas de tomateiro, com 5 isolados de bactérias endofíticas.

Em relação à pinta bacteriana, dois isolados controlaram a doença e promoveram o crescimento das plantas (Campos et al., 2002). Dessa forma, conclui-se que esses isolados são promissores para o controle de ambas as

bacterioses do tomateiro. Carrer Filho et al. (2002) obtiveram controle eficiente da mancha e pinta bacteriana do tomateiro com a utilização de um isolado de actinomiceto (RD-01), em casa de vegetação. Halfeld-Veira et al. (2002) conseguiram controle eficiente da mancha e pinta bacteriana do tomateiro com a utilização do isolado bacteriano UFV-IEA6 do filoplano. Silva et al. (2001) obtiveram alguns isolados de rizobactérias que exibiram aparente atividade de indução de resistência sistêmica à *Pst*, dada à separação espacial entre os antagonistas e o patógeno. Halfeld-Vieira et al. (2001) conseguiram bom controle desse mesmo patógeno com 3 isolados de bactérias do filoplano do tomateiro.

Assis et al. (1998), estudando o potencial antagônico de bactérias endofíticas no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra em repolho, verificaram 70,8% de redução da incidência da doença (RID) em casa de vegetação e 77% de redução da severidade da doença (RSD) em condições de campo.

Silva et al. (2004) realizaram um ensaio em condições de campo no qual a rizobactéria *Bacillus cereus* (UFV 101) foi aplicada no tomateiro via tratamento de sementes, isoladamente e em combinação com diferentes números de aplicações de clorotalonil na parte aérea. Observou-se que todos os tratamentos proporcionaram redução da severidade da pinta preta (*Alternaria solani*), mela (*Phytophthora infestans*) e septoriose (*Septoria lycopersici*) e aumento de produtividade em relação ao tratamento controle. Neste ensaio foi possível concluir que, no tratamento envolvendo a rizobactéria, mais dez pulverizações com o fungicida foram tão eficientes quanto vinte pulverizações com o fungicida, sem a rizobactéria, permitindo assim reduzir o número de pulverizações pela metade.

Vários fatores apontam as bactérias endofíticas como potenciais agentes de ISR. As endofíticas têm uma natural e íntima associação com as plantas. Os tecidos internos das plantas, além da uniformidade às condições ambientais proporcionam proteção ao efeito do meio externo quando comparados com as rizobactérias e as bactérias do filoplano (Chen et al., 1995). Essas bactérias devem competir por nutrientes com outros microrganismos e sofrem flutuações de temperatura e umidade, bem como exposição à radiação ultravioleta na superfície.

Além dessas vantagens, o potencial das bactérias endofíticas é pouco explorado. Aplicações da bactéria endofítica pela injeção na haste de plantas de algodão reduziram a podridão de raiz causada por *Rhyzoctonia solani* e murcha vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Chen et al., 1995). Estas bactérias se movem de forma ascendente e descendente do ponto de aplicação e, por meio da colonização dos tecidos internos, podem evitar a entrada do patógeno pelo sistema vascular. Outros controles efetivos têm sido observados com o uso destas bactérias, tais como. *F. solani* em algodão e *Sclerotium rolfsii* em feijão (Pleban et al., 1995). Em ervilha, a colonização da epiderme, cortex e tecidos vasculares das raízes pela bactéria endofítica evitou a entrada de fungos ou restringiu o crescimento do micélio apenas na epiderme (Benhamou et al., 1996 a,b). Sementes de tomate tratadas com a bactéria endofítica *Bacillus pumilus* isolado SE 34 evitou a entrada do fungo *F. oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*, causador da murcha vascular, no feixe vascular e restringiu o crescimento micelial à epiderme ou à parte externa do córtex da raiz (Benhamou et al., 1998). Similarmente, aplicações de *P. fluorescens* isolado 63-28 evitaram o crescimento de *Pythium ultimum* em ervilha (Benhamou et al., 1996a, 1996b) e *F. oxysporum* f. sp. *radici-lycopersici* em tomate (M'Piga et al., 1997).

O uso de isolados endofíticos para ISR é mais benéfico em culturas propagadas vegetativamente, tais como banana e cana-de-açúcar, por exemplo.

Viswanathan (1999) e Viswanathan & Samiyappan (1999) observaram que a bactéria endofítica *P. fluorescens*, isolado EP1, obtido de tecidos do colmo da cana-de-açúcar, induziu resistência sistêmica contra *Colletotrichum falcatum* causador da raiz vermelha. Assim, quando a bactéria endofítica é introduzida no material propagativo, ela sobrevive e se movimenta no interior do vegetal e, conseqüentemente, o material propagativo também terá a bactéria endofítica previamente introduzida, reduzindo a necessidade de freqüentes aplicações.

Nos últimos anos tem-se buscado reduzir a quantidade de defensivos utilizados, devido ao elevado impacto ambiental ou mesmo pela busca por produtos naturais ou biológicos. Assim, no meio científico tem sido necessário o rápido desenvolvimento de produtos biológicos efetivos. Backman et al. (1997) relataram que 60%-75% da cultura do algodão nos EUA são tratados com Kodiak®, produto à base de *B. subtilis* utilizado para o controle de patógenos do solo, tais como *Fusarium* e *Rhyzoctonia*. Este produto também é utilizado em amendoim, soja, milho e culturas produtoras de grãos e hortaliças. Na China, 18 isolados de PGPR comercias ou suas misturas são vendidos, sendo a maioria deles derivados do gênero *Bacillus* (Backman et al., 1997).

Um produto em recente desenvolvimento, chamado LS213, contém, na sua formulação, esporos de *B. subtilis* isolado GBO3, *B. amyloliquefaciens* isolado IN937a e quitosana como formulação padrão. Em recentes experimentos em casa de vegetação, LS213 aumentou significativamente o crescimento de tomate, pepino, fumo e pimentão e promoveu proteção contra mancha bacteriana e requeima do tomate, mancha angular do pepino e míldio do fumo (Reddy et al., 1999).

Vegetais produzidos por plantas tratadas com LS213 exibiram significante proteção contra danos causados por nematóides e antracnose em

pepino e mancha bacteriana do tomate depois de transplantadas para o campo (Kenney et al., 1999).

2.2.4.4 PGPR no controle de fitobacterioses

Para o sucesso do manejo da doença, é importante buscar as maneiras mais efetivas, práticas e econômicas para proteção da planta. PGPR são bactérias colonizadoras de raízes com efeitos benéficos tais como promoção de crescimento e agente de controle biológico. Nos últimos anos, o uso de PGPR como um indutor de resistência sistêmica em plantas cultivadas contra diferentes patógenos tem sido demonstrado sob condições de campo (Wei et al., 1991; 1996; Vidyasekaran & Muthamilan, 1999; Viswanathan, 1999; Viswanathan & Samiyappan, 1999).

PGPR induz resistência em plantas contra as doenças fúngicas, bacterianas e viróticas (Liu et al., 1995a, 1995b; Maurhofer et al., 1998) e aquelas incitadas por nematóides (Sikora, 1988; Naves, 2000). A resistência sistêmica adquirida é provada pela separação espacial do patógeno e a PGPR nas plantas (Van Peer et al., 1991).

PGPR utiliza diferentes mecanismos para suprimir os patógenos de plantas. Dentre eles, tem-se a competição por nutrientes e espaço (Elad & Chet, 1987), antibiose pela produção de antibióticos (Pierson & Thomashow, 1992) e produção de sideróforos, pigmento verde amarelado fluorescente (Lemanceau et al., 1992). Outro importante mecanismo inclui a produção de enzimas líticas, tais como as quitinases e β-1,3-glucanases que degradam e a quitina e a glucana presentes na parede celular dos fungos (Frindlender et al., 1993; Lim et al., 1991; Velazhahan et al., 1999), produção HCN (Defago et al., 1990) e degradação de toxinas produzidas pelo patógeno (Borowitz et al., 1992; Duffy & Defago, 1997).

PGPR também podem induzir proteção sistêmica contra doenças bacterianas. Sementes tratadas com *P. fluorescens* isolado 97 protegeram o feijoeiro contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* (Alstrom, 1991), enquanto que o tratamento de sementes de pepino com *P. putida* isolado 89B-27, *Flavomonas oryzihabotans* isolado INR-5, *S. marcercens* isolado 90-166 e *Bacillus pumillus* isolado INR-7 promoveu proteção contra mancha angular causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Lui et al., 1995b; Wei et al., 1996).

É sabido que a maioria dos controles biológicos que ocorrem na natureza é resultado da mistura de antagonistas em vez de uma alta população de um único antagonista. Assim aplicações da mistura de agentes de biocontrole serão mais eficientes e abrangem um maior espectro de ação (Duffy & Weller, 1995; Guo et al., 2004). Aplicação de misturas de três isolados de PGPR, tais como *Bacillus pumilus* isolado INR 7, *B. subtilis* isolado GB03 e *Curtobacterium flaccumfaciens* isolado ME1 em tratamento de sementes resultou em aumento da promoção de crescimento e maior efetividade na redução da severidade das doenças. Isso se deveu, provavelmente, à adição dos diferentes mecanismos de atuação de cada isolado PGPR (Raupach & Kloepper, 1998). Guo et al. (2004) realizaram a mistura de 3 PGPR, tais como *Serratia, Pseudomonas, Bacillus,* e obtiveram excelentes resultados no controle da murcha bacteriana do tomateiro, com variação de 63,4% a 99,5% e aumentos de produtividade da ordem de 35,4% a 67,0%, em função do tempo de estocagem desta formulação.

O primeiro ensaio de campo no qual se obteve sucesso com as PGPR foi em pepino, em que o tratamento das sementes seguido pela aplicação via irrigação do solo reduziu os sintomas da murcha bacteriana (Wei et al., 1995) e também controlou a mancha angular e antracnose (Wei et al., 1996).

Há outros exemplos na literatura em relação à utilização de agentes de biocontrole, PGPR, com redução da severidade das doenças da parte aérea e aumentos na produtividade na cultura do tomate (Silva & tal., 2004; Guo et al., 2004), cana (Viswanathan & Samiyappan, 2002), arroz (Vidhyasekaran et al., 2001), pepino (Zhender e tal., 1997; Raupach & Kloepper, 1998; Liu et al., 1995b), repolho (Assis et al., 1998). Em experimentos de campo com arroz, o tratamento de sementes com um produto contendo *P. fluorescens* (10^8ufc/g), seguido de três pulverizações foliares com o mesmo produto (1kg/ha) aos 45, 60 e 75 dias da semeadura, efetivamente controlou a mancha bacteriana provocada por *X. oryzae pv. oryzae* e proporcionou aumentos na produtividade da ordem de 29,51 a 63% em relação ao controle para os anos de 1995, 1996 e 1997, respectivamente, enquanto o tratamento padrão com estreptomicina só foi superior ao controle no ano de 1997 (Vidhasekaran et al., 2001).

As PGPR são agentes ideais para disparar a proteção das plantas pois elas podem ser aplicadas na semente, irrigando o solo próximo às raízes das plantas ou no transplante. Sendo assim uma alternativa eficiente no controle de patógenos do solo e da parte aérea, uma vez que, a maior vantagem das PGPR é que uma vez a resistência sistêmica sendo induzida, os mecanismos de defesa naturais das plantas ficam operando por um longo período mesmo se a população da bactéria indutora declinar por um tempo (van Loon et al., 1998a; 1998b).

Um ponto deve ser lembrado, pois de acordo com resultado experimentais, observou-se que os produtos a base de PGPR quando utilizados isoladamente dão um bom nível de controle, mas este nível de controle varia de um ano para outro pois depende das condições ambientais propícias ao microrganismo indutor. Assim o melhor caminho deve ser a combinação da PGPR com outras estratégias de manejo, tais como, variedades tolerantes ou resistentes, práticas culturais etc. (Gorlach et al., 1996; Zehnder et al., 2001).

Certamente as PGPR representam uma potencial ferramenta de proteção para as hortaliças onde há dificuldade de encontrar no mercado produtos eficientes para o controle principalmente de bacterioses (Zehnder et al., 2001).

Como são escassas as pesquisas relativas ao controle biológico da mancha e pinta bacteriana do tomateiro, a busca por isolados bacterianos endofíticos para controle dessas enfermidades é plenamente justificável.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D.; KLOPPER, J. W. Seed-borne bacterial endophytes in different cotton cultivars. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. S97, July/Sept. 1996. Abstr.

AGUIAR, L. A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A. M. C.; CASTILHO, K. S. C.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F.; CARMO, M. G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, Seropédica, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2000.

ALSTROM, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere paseudomonads. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 37, n. 6, p. 495-501, Dec. 1991.

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for biological control of plant diseases. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.). **Enviromentally safe approaches to crop disease control.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. p. 95-109.

BALDINI, E. M.; KUROZAWA, C. Comportamento de genótipos de tomateiro inoculados com *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*, agente da mancha bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 177-182, set. 1990.

BARRETTI, P. B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencial para o biocontrole de enfermidades do tomateiro.** 2001. 38 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BASHAN, Y.; DIAB, S.; OKON, Y. Survival of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 68, n. 2, p. 161-170, 1982.

BELL, C. R.; DICKIE, G. A.; HARVEY, W. L. G.; CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 1, p. 46-53, Jan. 1995.

BENHAMOU, N.; BELANGER, R. R.; PAULITZ, T. C. Induction of differential host response by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 1, p. 114-178, Jan. 1996a.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMANN, A.; TUZUN, S. Induction of defence-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology,** Rockville, v. 112, n. 3, 919-929, Nov. 1996b.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultra structure and cytochemistry of the host response. **Planta,** Berlin, v. 204, n. 2, p. 153-168, Feb. 1998.

BOROWITZ, J. J.; STANKIE-OIEZ, M.; LEWICKA, T.; ZUKOWSKA, Z. Inhibition of fungal cellulose, pectinase and xylanase activity of plant growth promoting fluorescent psedomonads. **Bulletin OIL BISROP,** v. 15, p. 103-106. 1992.

CAMERON, R. K.; DIXON, R.; LAMB, C. Biologically induced systemic acquired reistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal,** Oxford, v. 5, n. 5, p. 715-725, May 1994.

CAMPOS, J. R.; SOUZA, R. M.; KOBAYASTI, L. Seleção de bactérias endofíticas como promotoras de crescimento e como indutoras de resistência em tomateiro à pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae pv tomato*) e à mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris pv vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 27, p. 57, ago. 2002. (Resumo).

CARMO, M. G. F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L. A.; CARVALHO, A. O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* em sementes de pimentão. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 21, n. 1, p. 336-341, set. 1996b.

CARMO, M. G. F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L. A.; CARVALHO, A. O. Progresso da Pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*, em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira,** Brasilia, v. 21, n. 1, p. 62-70, mar. 1996a.

CARMO, M. G. F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A. O. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inoculo e

do emprego ou não do controle com oxicloreto de cobre. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v. 19, n. 3, p. 342-347, nov. 2001.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O.; BATISTA, U. G. Amplitude e efetividade de um actinomiceto pré-selecionado como agente de biocontrole de enfermidades do tomateiro, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 27, p. 222-223, ago. 2002. Resumo.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany,** Ottawa, v. 74, n. 3, p. 321-322, Mar. 1996.

CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J. W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control,** San Diego, v. 5, n. 1, p. 83-91, Mar. 1995.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promotiong rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Ed.). **Mannagement of soil born diseases.** Ludhiana: Kalyani Pushers, 1996. Chap. 8, p. 165-184.

CHESTER, K. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quartely Review Biology,** New York, v. 8, p. 129-151, 1933.

COLIN, J. E.; CHAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. **Plant Disease,** St. Paul, v. 70, n. 11, p. 1048-1050, Nov. 1986.

COLIN, K. C.; McCARTER, S. M. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae pv tomato* in vitro and controlling bacterial speck. **Plant Disease,** St. Paul, v. 67, n. 6, p. 639-640, June 1983.

DEFAGO, G.; BULING, C. H.; BURGER, U.; HASS, D.; KAHR, G.; KELL, C.; VOISARD, C.; WIRTHNER, P.; WUTHRING, B. Supression of black root rot of tobacco an other root diseases by strains fo Pseudomonas fluorescens: potencial application and mechanisms. In: HORNBY, D. (Ed.). **Biological control of soilborne plant pathogens.** Wellingford: CAB International, 1990. p. 93-108.

DIAB, S.; BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. **Phytopathology,** St. Paul, v. 72, n. 12, p. 1257-1260, Dec. 1982.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBEREDO, M. R.; CABALILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophytic of sugarcane stems. **Plant Physiological**, Rockville, v. 105, n. 4, p. 1139-1147, Aug. 1994.

DUFFY, B. K.; DEFAGO, G. Zine improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibiting to bacterial antibiotic biosynthesis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1250-1257, Dec. 1997.

DUFFY, B. K.; WELLER, D. M. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with *fluorescens Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 2, p. 907-911, Feb. 1995.

ELAD, Y.; CHET, I. Possible role of competion for nutrition in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 2, p. 190-195, Feb. 1987.

FOSTER, R. C.; ROVIRA, A. D.; COCK, T. W. **Ultraestructure of the root-soil interface.** St. Paul: American Phytopathological society, 1983.

FRINDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soil-borne plant pathogens by a ß-1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biological Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1211-1221, Sept. 1993.

FROMMEL, M. I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and development modifications of 'in vitro' grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 928-936, July 1991.

GARDNER, J. M.; FELDMAN, A. W.; ZABLOTOWICZ, R. M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus treess. **Applied Envirnmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1335-1342, 1982.

GETZ, S.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T. Scanning electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected with *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 1, p. 39-43, Jan. 1983.

GITAITIS, R.; JONES, J. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. **Plant Disease,** St. Paul, v. 76, n. 7, p. 651-656, July 1992.

GOEL, A. K.; LAURA, R. D.; PATHAK, D. V.; GOEL, A. Use of biofertilizers: Potencial, constraints and future strategies – a review. **International Journal of Tropical Agriculture,** Bonn, v. 17, n. 1, p. 1-18, 1999.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell,** Rockville, v. 8, n. 4, p. 629-643, Apr. 1996.

GOTO, M. **Fundamentals of bacteria plant pathology.** San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

GOTO, M.; HIKOTA, T, T.; KYUDA, T.; NAKAJIMA, M. Induction of copper resistance in plant-pathogenic bacteria exposed to glutamate, plant extracts, phosphate buffer, and some antibiotics. **Phytopathology,** St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1449-1453, Dec. 1993.

GUO, J. H.; QI, H. Y.; GUO, Y. H.; GE, H. L.; GONG, L. Y.; ZHANG, L. X.; SUN, P. H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control,** San Diego, v. 29, n. 1, p. 6-72, Jan. 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MENDONÇA, H. L.; MIZUBUTI, E. S. G. Eficiência de bactérias do filoplano no controle biológico de doenças foliares do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 27, p. 183-184, ago. 2002. Resumo.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, A. L. R.; GARCIA, F. A. O.; MIZUBUTI, E. S. G. Seleção de bactérias de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole parta três patógenos foliares. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 26, p. 488. Ago. 2001. Resumo.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, Oct. 1997a.

HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Indigenous rhizosphere and endophytic microorganisms associated with chitin-induced nematode suppressiveness. **Nematotropica,** Orlando, v. 27, 1997b.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced resistance to disease in plants.** Dordrechtl, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1985. p. 182.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; Van LOON, L. C. inducing resistance: a summary of papers presented at the first Internacional symposium on Induced Resistance to Plant Diseas, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology,** Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 1-6, Jan. 2001.

HEATH, M. C. The absence of active defence mechanisms in compatible host-pathogen interations. 1982.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic simbiont of corn. **Mycopathologia,** Dordrecht, v. 129, n. 2, p. 117-125, 1995.

HUANG, J. S. Ultraestructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review Phytopathology,** Palo Alto, v. 24, p. 141-157, 1986.

HURBERT, J. J.; HELTON, A. W. A translocated resistance phenomenon in *Prunus domestica* induced by initial infection with *Cytospora cineta.* **Phytopathology,** St. Paul, v. 57, n. 10, p. 1094-1098, Oct. 1967.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLEN-BERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology,** Oxford, v. 176, n. 7, p. 1913-1923, Apr. 1994.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus.* **Journal of Experimetal Botany,** Oxford, v. 45, n. 275, p. 757-766, June 1994.

JARDINE, D. J.; STEPHENS, C. T. Influence of timing of application and chemical on control of bacterial speck of tomato. **Plant Disease,** St. Paul, v. 71, n. 5, p. 405-408, May 1987a.

JARDINE, D. J.; STEPHENS, C. T. A predictive system for timing chemical applications to control *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, causal agent of bacterial speck. **Phytopathology,** St. Paul, v. 77, n. 6, p. 823-827, June 1987b.

JONES, J. B. Bacterial Speck. In: JONES, J. B.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases.** Minneapolis: APS Press, 1993. 73 p.

KADO, C. I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G. (Ed.) **The prokaryotes.** New York: Springer-Verlag, 1992. p. 660-662.

KENNEY, D. S.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W. Commercial potencial of biological preparations for vegetable transplants. **Phytopathology,** St. Paul, v. 89, p. S39, 1999. Abstract.

KIMURA, O.; CARMO, M. G. F. do. Doenças causadas por bactérias em pimentão. **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 66-76, 1996.

KLOPPER, J. W.; WEI, G.; TUZUN, S. Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promotion rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichun orbiculare*. In: TJAMOS, E. S. (Ed.). **Biological Control of plant diseases.** New York: Plenum Press, 1992. p. 185-191.

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1112-1120, Nov. 1996.

LEMANCEAU, P.; BAKKER, P. A. H. M.; DEKOGEL, W. J.; ALABOUVETTE, C.; SCHIPPERS, B. Effect of pseudobactin 358 produced by *Pseudomonas putida* WSC 358 on suppression of Fusarium wilt of carnations by non pathogenic *Fusarium axysoporum*. **Applied Environmental Microbiology,** Washington, v. 58, n. 9, p. 2978-2980, Sept. 1992.

LIM, H.; KIM, Y.; KIM, S. Pseudomonas stutzeri YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. **Applied Environmental Microbiology,** Washington, v. 57, n. 2, p. 510-516, Feb. 1991.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promotiong rhizobacteria. **Phytopathology,** St. Paul, v. 85, n. 7, p. 843-847, July 1995a.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promotiong rhizobacteria. **Phytopathology,** Sst. Paul, v. 85, n. 6, p. 695-698, June 1995b.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promotiong rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection an root colonization. **Phytopathology,** St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1064-1068, Oct. 1995c.

LOPES, C. A. Bacterioses de hortaliças: situação atual e perspectivas de controle. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado de doenças, pragas e plantas daninhas.** Viçosa: UFV, 2000. p. 187-208.

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, 2001. p. 105-123.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças:** diagnose e controle. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1997. 70 p.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIN, L.; do VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas** – hortaliças. Voçosa, 2000. v. 2, p. 757-800.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; MELO, P. E. Differential Resistance of tomato cultigens to biovars I and III of Pseudomonas solanacearum. **Plant Disease** St. Paul, v. 78, n. 11, p. 1091-1094, Nov. 1994.

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

M'PIGA, P.; BELANGER, R. R.; PAULISTZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological Molecular Plant Pathology,** London, v. 50, n. 5, p. 301-320, May 1997.

MAHAFFEE, W. F.; BAUSKE, E. M.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER BRINK, M.; KLOPPER, J. W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescente colony staining and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a rhizobacterium. **Applied Environmental Microbiological,** Washington, v. 63, n. 4, p. 1617-1622, Apr. 1997a.

MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER BRINK, M. Endophytic colonization of Phaseolus

vulgaris by Pseudomonas fluorescens strain 89B-27 and Enterobacter asburiae strain JM22. In: RYDER, M. H.; STEPHENS, P. M.; BOWEN, G. D. (Ed.). **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria.** Melbourne: CSIRO, 1997b. p. 180.

MARCO, G. M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. **Plant Disease,** St. Paul, v. 67, n. 7, p. 779-781, July 1983.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes,** Brasília, v. 16, n. 2, p. 191-194, 1994.

MAURHOFER, M.; REIMMANN, C.; SACHERER, S. P.; HEEB, S.; HAAS, D.; DEFAGO, G. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. **Phytopathology,** St. Paul, v. 88, n. 7, p. 678-684, July 1998.

McCARTER, S. M.; JONES, J. B.; GITAITIS, R. D.; SMTLEY, D. R. Survival of *Pseudomonas syringae pv tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue and epiphytic weed hosts in Georgia. **Phytopathology,** St. Paul, v. 73, n. 10, p. 1393-1398, Oct. 1983.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 41, n. 10, p. 895-901, Oct. 1995a.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophyties from cotton and swet corn. **Plant Soil,** Dordrecht, v. 173, n. 2, p. 337-342, June 1995b.

MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. Chemical forms of copper on leaves in relation to the catericidal activity of cupric hidroxid deposit. **Phytopathology,** St. Paul, v. 78, p. 1608, 1988. Abstr.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology,** Sst. Paul, v. 80, n. 9, p. 808-811, Sept. 1990.

MOSS, M. A.; POHRONEZNY, K.; SCHENK, J.; DANKERS, W. Effect of irrigation method on the development of bacterial spot epidemics on tomato. **Phytopathology,** St. Paul, v. 77, n. 12, p. 1712, Dec. 1987. Abstrac.

MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomateiro. **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 15-18, 1996.

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied Environmental Microbiology,** Washington, v. 32, n. 5, p. 694-698, 1976.

NASCIMENTO, A. S. **Bactérias endofíticas no controle de Ralstonia solanacearum e Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis do tomateiro.** 1998. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

NAVES, R. L. **Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonemtóides.** 2000. 113 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O'GARRO, L. W. Bacterial Spot of tomato and pepper on four East Caribbean islands: Races, their abundance, distribution, aggressiveness and prospects for control. **Plant Disease,** St. Paul, v. 82, n. 8, p. 864-870, Aug. 1998.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 24, n. 6, p. 734-742, 1978.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and proceses of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 29, n. 8, p. 900-915, 1983.

PERNEZNY, K.; COLIINS, J. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* on pepper: Relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. **Plant Disease,** St. Paul, v. 81, n. 7, p. 791-794, July 1997.

PERNEZNY, K.; DATNOFF, L. E.; MUCLLER, T.; COLLINS, J. Losses in fresh-market tomato production in Florida due to target spot and bacterial spot and the benefits of protectant fungicides. **Plant Disease,** St. Paul, v. 80, n. 5, p. 599-563, May 1996.

PHILIPSON, M. N.; BLAIR, I. D. Bacteria in clover root tissue. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 3, n. 2, p. 125-129, 1957.

PIERSON, L. S.; THOMASHOW, L. S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 4, p. 330-339, 1992.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; LÉO-KLOOSTERZIEL, K. M.; KEURENTJES, J. J. B.; VERHAGEN, B. W. M.; KNOSTER, M.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P. A. H. M.; VAN LOON, L. C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 51-61, Jan. 2001.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOSTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistanse in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 9, p. 1571-1580, Sept. 1998.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of Rhizoctonia solani and Sclerotium rolfsii in the grenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, n. 6, p. 665-672, Nov. 1995.

POHRONEZNY, K.; HEWITT, M.; INFANTE, J.; DATNOFF, L. Wind and wind-generated sand injury as factors in infection of pepper by *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1036-1039, Oct. 1992.

POHRONEZNY, K.; MOSS, M. A.; DANKERS, W.; SHENK, J. Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, n. 10, p. 800-805, Oct. 1990.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interation with other palnt-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 254-259, Mar. 1997.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1144-1154, Nov. 1996.

QUIESPEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. In: VERMA, D. P. S. (Ed.). **Molecular signals in plant-microbcommunications.** Bora Raton: CRC Press, 1992. p. 471-490.

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 10, p. 1158-1164, Oct. 1998.

REDDY, M. S.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KENNY, D. S.; RYU, C. M.; ZHANG, S.; YAN, Z.; MARTINEZ-OCHOA, N.; KLOEPPER, J. W. Growth promotion and induced systemic resistance (ISR) mediated by a biological preparation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. S65, 1999. Abstract.

REINHOLD, B.; HUREK, T. Location of diazotrophs in the interior with special attention to the kallar grass association. **Plant Soil,** Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 259-268, Aug. 1988.

ROBBS, C. F. Tomate: doenças causadas por bactérias. **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v. 11, n. 131, p. 45-50, nov. 1985.

ROSS, A. F. Systemic acquired resistance by localized virus infection in plants. **Virology,** San Diego, v. 14, n. 3, p. 340-358, 1961.

ROTEM, J. Fungal diseases of potato and tomato in the Negev desert. **Plant Disease,** St. Paul, v. 65, n. 4, p. 315-318, Apr. 1981.

SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. Microflora within healthy tomatoes. **Applied Microbiology,** Washington, v. 9, n. 1, p. 20-25, 1961.

SHARROCK, K. R.; PARKES, S. L.; JACK, H. K.; REES-GEORGE, J.; HAWTHORNE, B. T. Involvemente of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* d. hybrid 'Delica'). **New Zealand Journal of Crop and Horticulltural Science,** Wellington, v. 19, p. 157-165, 1991.

SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Medelingen RijkFaculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniv. Gent.** 53/2b, p. 867-878, 1988.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. L.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: Eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* e efeitos sobre a

semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 27, n. 6, p. 586-593, nov./dez. 2002.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J. L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus Cereus* against tomato foliar disease under field conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 6, p. 371-375, June 2004.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; DEUNER, C. C.; CARRER FILHO, R.; GARCIA, F. A. O. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae pv tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 281, ago. 2001. Resumo.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae pv. tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 179-183, jun. 1995.

SPRENT, J. I.; de FARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 157-165, Aug. 1988.

STICHER, I.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

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

STURTZ, A. V.; MATHESON, B. G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 184, n. 2, p. 265-271, 1996.

TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T. Doenças do tomateiro *Lycopersicum esculentum* Mill. In: GALLI, F. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 511-552.

TON, J.; DAVISON, S.; VAN, W. S. C. M.; VAN, L. L. C.; PIETERSER, C. M. J. The Arabidopsis ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistanse is envolved in ethylene signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 2, p. 652-661, Feb. 2001.

TREVET, I. W.; HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs of health palnts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 38, n. 10, p. 960-967, Oct. 1948.

TUZUN, S.; KLOPPER, J. W. Potencial Apllications of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Induced systemic Disease Resistance. In: REUVENI, R. (Ed.). **Novel approches to integrated pest management.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. p. 115-127.

TUZUN, S.; KUC, J. Plant immunization: an alternative to pesticides for control of plant diseases in green house and field. In: BAY-PETERSON, J. (Ed.). **The biological control of plant diseases.** Taiwan: Food and Fertilizer Technology Centre, 1991. p. 30-40.

VAN BUREN, A. M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C. A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology,** St. Paul, v. 83, p. 1406, 1993. Supplement.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology,** Dordrecht, v. 103, 753-765, 1997.

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

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PETERSE, C. M. J.; DUFFY, B.; ROSENBERGER, U.; DEFAGO, G. Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. Bulletin OILB SROP, v. 21, p. 103-110, 1998b.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium kilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCX 417r. **Phytopathology,** St. Paul, v. 81, n. 7, p. 728-734, July 1991.

VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth response to bacterization with select *Pseudomonas* spp. Strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 35, n. 4, p. 456-463, Apr. 1989.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas.* **International Journal Systematic Bacteriology,** Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.

VELAZHAHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. M.; VIDHYASEKARAN, P. Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens*

isolates against *Rhizocyonia solani* and their production of lytic enzyme. **Journal of Plant Disease Protection,** Stuttgart, v. 106, n. 3, p. 244-250, May 1999.

VIDHYASEKARAN, P.; KAMALA, N.; RAMATHAN, A.; RAJAPPAN, K.; PARANIDHARAN, V.; VELAZHAHAN, R. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pfl against *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica,** Rehovot, v. 29, n. 2, p. 155-166, 2001.

VIDHYASEKARAN, P.; MUTHAMILAN, M. Evaluation of powder formulation of *Psedomonas fluorescens* Pfl for control of rice sheath blight. **Biocontrol Science and Technology,** Hants, v. 9, n. 1, p. 67-74, Mar. 1999.

VISWANATHAN, R. **Induction of systemic resistance against red rot disease in sugarcane by plant growth promoting rhizobacteria.** 1999. 175 p. Thesis (PhD) - TNAU, Coimbatore, India.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease caused by *Colletotrichum falcatum* went in sugarcane. **Proceedings of Sugar Technology of India,** New York, v. 61, p. 24-39, 1999.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum.* **Crop Protection,** Oxford, v. 21, n. 1, p. 1-10, Feb. 2002.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to Colletotrichum orbiculare by select atrains of plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology,** St. Paul, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, Dec. 1991.

WEI G.; YAO, C.; ZEHNDER, G. W.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Induced systemic resistance by select plant growth-promoting rhizobacteria against bacterial wilt of cucumber and the beetle vectors. **Phytopathology,** St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1154, 1995. Abstract.

WEI, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induced sustemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology,** St. Paul, v. 86, n. 2, p. 221-224, Feb. 1996.

ZAMBOLIM, L.; Do VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle integrado das doenças de hortaliças**. Viçosa, 1997. 122 p.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; YAO, C.; WEI, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, n. 2, p. 391-396, Apr. 1997.

ZEHNDER, G. W.; MURPHY, J. F.; SIKORA, E. J.; KLOEPPER, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 39-50, Jan. 2001.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS ENDOFÍTICAS, POR ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS

1 RESUMO

SILVA, Juliana Resende Campos. Isolamento, caracterização e identificação de espécies bacterianas endofíticas, por análises de ácidos graxos. In: **Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro.** 2004. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Foram obtidos 53 isolados bacterianos a partir de folhas e hastes de tomateiro e pimentão e caracterizados como endofíticos de acordo com o método de isolamento empregado. As espécies de *Bacillus* apresentaram colônias com bordos lisos a enrugados e coloração variando de branca a amarelada ou creme. Entretanto, a coloração das colônias e da morfologia dos bordos variou muito entre isolados. Todos os isolados não demonstraram capacidade de produção de pigmentos fluorescentes. Cerca de 73,07% dos isolados foram Gram positivos e o restante Gram negativos. Também foi alto o número de isolados produtores de amilase e com capacidade de crescer na ausência do oxigênio. A identificação das espécies, entre os isolados endofíticos, foi feita por meio da análise do perfil de ácidos graxos, em um cromatógrafo a gás acoplado a um computador, utilizando-se o protocolo da Universidade de Auburn, Alabama (EUA). Em 45 isolados trabalhados, foram identificadas as seguintes espécies: *Acinetobacter johnsonii, Bacillus amyloliquefaciens, B. cereus, B. megaterium, B. marinus, B. mycoides, B. pumillus, B. sphaericus, B. subtilis, Curtobacterium luteum, Kocuria kristine, Microbacterium liquefaciens, Paenibacillus macerans, Pseudomonas putida, Staphylococcus aureus.* O gênero mais abundante foi *Bacillus* com 9 espécies, predominando a espécie *B. pumillus.*

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador) e Édson Ampélio Pozza - UFLA

2 ABSTRACT

SILVA, Juliana Resende Campos. Isolation, characterization and identification of species of endophytic bacteria by fatty acid analyses. In: **Control of bacteria spot (*Xanthomonas vesicatoria*) and bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by endophytic bacteria.** 2004. 160 p. Dissertation (Master Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Fifty three bacterium isolates were isolated from leaves and stems of tomatos and peppers and characterized as endophytic bacteria according to the isolation method used. Species of Bacillus showed white to yellow or creme colonies with smooth and wrinkled edges but varing so much either in color or edge morphology of the colonies among isolates. All isolates did not show capacity to produce fluorescents pigments. Seventy three percent of the isolates were Gram positives and the rest negatives. Also were high the numbers of isolates that produced amylase and that demonstrated capacity to grow in absence of oxygen. The species identification were done by fatty acid analyses using gas chromatography linked to the computer using the protocol of Auburn university, Alabama, USA. In forty five worked isolates were identified the following species: *Acinetobacter johnsonii, Bacillus amyloliquefaciens, B. cereus, B. megaterium, B. marinus, B. mycoides, B. pumillus, B. sphaericus, B. subtilis, Curtobacterium luteum, Kocuria kristine, Microbacterium liquefaciens, Paenibacillus macerans, Pseudomonas putida, Staphylococcus aureus.* The genus *Bacillus* was the most encountered with nine species, predominating the *B. pumillus* species.

* Guindance Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Édson Ampélio Pozza - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Bactérias endofíticas residem em tecidos internos de plantas nas sementes e óvulos (Mundt & Hinkle 1976), tubérculos (Trevet & Hollis, 1948), raizes (Philipson &Balir 1957), hastes, folhas e frutos (Samish et al., 1961; Sharrock et al., 1991). A capacidade da bactéria em colonizar os tecidos internos das plantas pode conferir uma vantagem ecológica sobre aquelas que podem somente colonizar as plantas epifiticamente. Os tecidos internos das plantas, além da uniformidade às condições ambientais, proporcionam melhor proteção do meio externo aos microrganismos do que a superfície das plantas, onde estão expostos a condições ambientais extremas de temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana limitando a sua sobrevivênvia. No interior das plantas, as bactérias se mantêm localizadas em tecidos específicos como córtex da raiz ou sistemicamente pelo transporte através dos vasos condutores ou apoplasticamente (Hurek et al., 1994; James et al., 1994; Mahaffee et al., 1997a; 1997b; Quandt-Hallmann et al., 1997; Patriquin & Dobereiner 1978). Uma vez estabelecida no interior da planta, estas podem ser transmitidas vegetativamente, tal como ocorreu com *Acetobacter dizotrophicus* por dois cortes sucessivos em cana-de-açúcar (Dong et al., 1994).

Geralmente, as bactérias endofíticas localizam-se nos espaços intercelulares (Dong et al., 1994; Hinton & Bacon 1995; Quadt-Hallmann & Klopper 1996; Mahaffee et al., 1997a; 1997b; Patriquin & Dobereiner 1978; Reinhold & Hurek 1988), com apenas algumas pesquisas demonstrando a colonização intracelular (Frommel et al., 1991; Mahaffee et al., 1997a; 1997b; Quadt-Hallmann & Kloepper 1996). Já a colonização bacteriana no sistema vascular tem sido amplamente pesquisada (Bell et al., 1995; Lamb et al., 1996; Mahaffee et al., 1997b), entretanto, não se sabe ainda se o sistema vascular serve

apenas como meio de transporte para a bactéria endofítica ou se ela realmente se multiplica em seu interior. Assim, o crescimento e o estabelecimento das bactérias endofíticas no interior dos tecidos das plantas requerem nutrientes e Foster et al. (1983) sugerem que estas bactérias utilizam exsudatos encontrados nos espaços intercelulares em vez de degradar materiais mais complexos da parede celular.

A identificação de bactérias, no nível de espécie, tem sido possível pela análise de ácidos graxos, conforme técnicas descritas por De Boer & Sasser, (1986), Gitaitis & Beaver (1990) e Rizzo et al. (1987) que, aliadas à caracterização fisiológica, auxiliam no agrupamento de bactérias endofíticas com funções ecológicas e na relação com a planta e seus patógenos. Estudos sobre isolamento, identificação e caracterização são fundamentais para se iniciar trabalhos em controle biológico.

Ênfase tem sido dada ao isolamento e à caracterização de bactérias endofíticas nas duas últimas décadas (Hallman et al., 1997; McInroy & Kloppper 1995; Sturz 1995). Também neste período descobriu-se o seu papel no crescimento de plantas e na redução de sintomas de doenças causadas por vários patógenos de plantas.

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, isolar e identificar pelo método de ácido graxo e caracterizar morfológica e fisiologicamente bactérias endofíticas de haste e folhas de tomateiro e pimentão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Folhas e hastes de tomate (*Lycopersicum esculentum*) e de pimentão (*Capsicum annum*) foram coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), dando-se preferência para plantas aparentemente sadias. No local, após serem coletadas, as folhas e hastes foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas e transportadas ao laboratório, onde foram cuidadosamente lavadas em água de torneira para eliminar poeira e solo aderidos a elas. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a desinfestação superficial com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos para folhas e hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos para hastes, seguida de 3 lavagens de 1 minuto em solução tampão fosfato-potássico (PB).

Para desalojar da superfície do material vegetal as bactérias epifíticas remanescentes, as folhas e hastes foram, então, transferidas para frascos contendo solução tampão fosfato (PB) 0,02 M esterilizada (pH 7,0) e submetidas a banho de ultra-som por 10 minutos. A trituração das folhas e hastes foi feita em almofariz e pistilo esterilizados contendo PB e o triturado submetido a novo banho de ultra-som por 10 minutos para desagregação de partículas e células bacterianas. Procedeu-se a homogeneização do triturado e posterior diluição em série em soluçãp PB com fator de diluição 1:10. Retiraram-se, então, alíquotas de 100 µl das diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} que foram transferidas para placa de Petri contendo meio "trypic soy agar" (TSA) e espalhadas com a alça de Drigalsky.

Foram preparadas cinco placas para cada diluição e incubadas a 28°C por 48 horas em câmara de crescimento. Após esse tempo, as colônias bacterianas apresentando características morfológicas diferentes, dentro de uma

mesma amostra, foram repicadas em meio TSA pelo método de estrias em "T", visando à obtenção de colônias isoladas.

Para se certificar da natureza endofítica dos isolados, após o banho de ultra-som, como controle, alíquotas de 100 µl da solução de PB utilizada para aquela operação foram transferidas para placa de petri contendo meio TSA e incubadas nas mesmas condições descritas para as placas preparadas com as diluições dos triturados. Não havendo crescimento bacteriano nessas placas dentro de 48 horas, os isolados obtidos pela trituração das folhas e hastes foram considerados endofíticos.

Assim, objetivando a preservação dos isolados por um maior período de tempo, esses foram repicados para meio líquido peptona-glicerol, no qual permaneceram por 24 horas a 28°C. Após esse período, foram transferidos para tubos Eppendorff e mantidos em "freezer" a –80°C.

4.2 Identificação bacteriana dos isolados endofíticos por ácidos graxos

Na identificação dos isolados utilizou-se a análise de ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) (De Boer & Sasser, 1986; Gitaitis & Beaver, 1990; Rizzo et al., 1987) das culturas bacterianas, seguindo sistema montado na Universidade de Auburn (Alabama, EUA), utilizando-se cromatógrafo a gás acoplado a um computador com uma base de dados de 1300 espécies e gêneros endofíticos, além de 4500 de solo. Na preparação para a análise EMAG, os isolados bacterianos congelados foram repicados para TSA, incubados por 24 a 48 h a 28°C, observada a pureza de cada cultura. Alça plástica com extremidade em círculo foi usada para raspar a superfície da colônia, retirando-se uma porção completa do círculo contendo 40 mg que foi colocado no fundo do tubo de vidro.

Saponificação foi conduzida pela adição, em cada tubo, de 1,0 ml de reagente saponificante (45g de hidróxido de sódio, 150 ml de metanol, 150 ml de água deionizada), agitado por 10 segundos, aquecido por 5 minutos em banho-maria a 100°C, agitado novamente por 10 segundos e novo aquecimento por 25 minutos. Os tubos foram então resfriados em água à temperatura ambiente. A metilação foi conseguida pela adição de 2,0 ml de reagente (325 ml de 6N de HCl mais 275 ml de metanol) no mesmo tubo, agitado por 10 segundos e aquecido por 10 minutos em banho-maria a 80°C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, os EMAG foram removidos da fase aquosa ácida e transferidos para a fase orgânica pela adição de 1,25 ml de extratos solventes (200 ml de hexano, 200 ml éter metil butil terciário [EMBT]), misturados em agitador rotatório por 10 minutos, descartando-se a fase aquosa inferior com pipeta Pasteur. A fase orgânica foi lavada em 3 ml da solução básica (10,8g NaOH, 900 ml de água deionizada) sob agitação em agitador rotatório por 5 minutos. Dois terços da fase solvente superior foram removidos para a análise EMAG. As amostras preparadas foram estocadas a -20° C até o momento da análise no cromatógrafo a gás.

Os EMAG foram analisados em um cromatógrafo a gás da marca Hewlett-Packard série II modelo 5890, equipado com uma coluna capilar de fenil metil silicone. As amostras foram processadas com um sistema de identificação microbial (SIM) da MIDI (Newark, DE EUA), que calibrou o cromatógrafo a gás com uma mistura EMAG comercial antes de processar as amostras e após o processamento de dez delas. Os picos EMAG foram denominados pelo programa SIM e os isolados foram identificados usando o SIM "Biblioteca Aeróbica".

4.3 Caracterização fisiológica dos isolados endofíticos

Todos os isolados endofíticos foram caracterizados fisiologicamente para hidrólise de gelatina e amido, anaerobiose (Schaad et al., 2001), fluorescência em meio King B e reação de Gram. Para isso, os isolados mantidos em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) foram repicados e, a seguir, realizada a caracterização de acordo com cada teste:

a) produção de pigmentos fluorescentes em meio King B: com o objetivo de diferenciar bactérias do gênero *Pseudomonas* produtoras de substâncias fluorescentes das não fluorescentes, o meio de cultura King B (Mariano et al., 2000) foi colocado em tubo inclinado, para onde foram repicados os isolados de bactérias endofíticas e incubados por 48 horas em BOD a 28°C. A seguir, as colônias foram examinadas sob luz ultravioleta e, quando observado pigmento fluorescente (meio com coloração esverdeada e fluorescente), o isolado foi considerado produtor de substâncias fluorescentes e o resultado positivo para este teste. Utilizou-se como controle a bactéria *Pseudomonas syringae pv tomato,* na qual observa-se a pigmentação fluorescente característica;

b) reação de Gram: para diferenciar bactérias Gram-positivas das Gram-negativas utilizando-se o método de Ryu (Mariano et al., 2000). Assim, depositou-se 1 gota de KOH a 3% em lâmina comum de microscopia, e sobre ela, transferiu-se o crescimento bacteriano da cultura em meio sólido. A seguir, homogenizou-se bem por 5 a 10 segundos, com a própria alça de repicagem. De acordo com a aderência do líquido à alça, pôde-se avaliar a presença de viscosidade caracterizando a bactéria como Gram-negativa. Por outro lado, a falta de viscosidade caracterizava a bactéria como Gram-positiva. Esta viscosidade foi devido à dissolução da parede celular das bactérias Gram-

negativas com liberação de DNA bacteriano, o que não acontece com as Gram-positivas processadas nas mesmas condições;

c) anaerobiose: é utilizada para avaliar se a bactéria é ou não capaz de se multiplicar também na ausência de oxigênio. Assim, adicionou-se meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) às placas e, após sua solidificação, foram colocadas sobre ele três gotas da suspensão de bactéria endofítica em meio líquido e procedeu-se a homogeneização. A seguir, depositou-se na superfície do meio de cultura uma lamínula previamente flambada e incubou-a por 24-48 horas. Procedeu-se a avaliação observando-se o local de crescimento da bactéria: apenas na superfície do meio em contato com O_2 (aeróbia estrita) ou em toda a superfície do meio, inclusive debaixo da lamínula (anaeróbia facultativa);

d) hidrólise do amido: é utilizado para verificar se a bactéria produz a enzima amilase, sendo capaz de hidrolisar o amido. Assim, o meio EPGA foi distribuído nas placas de Petri e, após solidificação, foram semeadas as colônias das bactérias a serem testadas e incubadas a 28°C por 7 dias. Após o crescimento das colônias, colocou-se lugol sobre o meio, observando se houve ou não a hidrólise do amido. Quando o resultado foi positivo, observou-se descoloração em torno da colônia, contrastando com o restante do meio de coloração roxo-escura;

e) hidrólise da gelatina: este teste é utilizado para verificar se a bactéria é proteolítica, sendo capaz de decompor ou hidrolisar a gelatina, fazendo-a perder sua característica geleificante. Assim, o meio específico ao qual foi adicionada gelatina, foi distribuído em tubos de ensaio e, após solidificação, foram semeadas as colônias das bactérias a serem testadas e incubadas a 28°C por 7 dias. Tubos semeados ou não (controle) com a bactéria foram transferidos para geladeira e, após 30 minutos, examinados. Quando o meio se manteve líquido, caracterizou-se a bactéria como capaz de hidrolizar a gelatina. No controle, o meio permaneceu sólido.

4.4 Caracterização morfológica dos isolados endofíticos

Na fase de isolamento, as bactérias endofíticas foram caracterizadas em relação aos aspectos morfológicos das colônias, como coloração, bordos e diâmetro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação de espécies endofíticas por ácidos graxos

Foram obtidos 53 isolados de bactérias endofíticas (Tabela 1) a partir de folhas e hastes de tomateiro e pimentão sem sintomas de doenças, demonstrando a eficácia da técnica empregada, a qual permitiu o isolamento de bactérias que ocorrem em diversos nichos, como xilema, espaços inter e intracelulares. De fato, o emprego da desinfestação superficial e do banho de ultra-som tem sido feito com sucesso para isolamento de bactérias epifíticas da superfície de frutos (Janisiewicz, 1988; Melo et al., 1995), bem como para o isolamento de endofíticas (Assis et al., 1996; 1998). Vários trabalhos também têm demonstrado a ocorrência de bactérias endofíticas em diversas partes de plantas, tais como sementes e óvulos (Mundt & Hinkle, 1976), tubérculos (Tervet & Holiis, 1948), raízes (Philipson & Blair, 1957) caules e folhas (Henning & Willforth, 1940, citados por Hallmann et al., 1997) e frutos (Samish et al., 1961).

Foram identificados 8 gêneros e 16 espécies em 44 isolados. O gênero *Bacillus* foi o mais abundante com 8 espécies, perfazendo 30 isolados, predominando a espécie *B. pumillus*, com 12 isolados (Tabela 2). A predominância de espécies de *Bacillus* dentre as bactérias endofíticas também foi encontrada por Faria (2003), trabalhando com lodo de esgoto; Kupper & Gimenes Fernandes (2002), trabalhando com folhas e flores de citros; Kloepper et al. (1992b), trabalhando com raízes de soja, mucuna e mamona e Kloepper et al. (1992a), trabalhando com raízes de amendoim. De fato, no isolamento de agentes de biocontrole, sempre se observa a ocorrência do gênero *Bacillus* e este se destaca em eficácia no controle de fitobacterioses (Guo et al., 2004; Jetiyanon

& Kloepper, 2002; Kupper & Gimenes Fernandes, 2002; Gomes et al., 2003; Melo et al., 2002).

TABELA 1 Identificação das bactérias endofíticas, segundo método EMAG e reação de Gram.

Grupo	Taxon	Número de isolados obtidos por plantas hospedeiras			
		Pimentão		Tomate	
		Haste	Folha	Haste	Folha
Gram positiva					
	Tom 2			1	
	Bacillus pumilus	1	1	7	1
	Bacillus megaterium			1	
	Pim 11	1			
	Bacillus cereus	1			
	Curtobacterium luteum		1		
	Staphylococcus aureus		1		
	Bacillus subtilis			2	5
	Bacillus amiloliquefaciens				1
	Tom 23				1
	Tom 25				1
	Bacillus pumilus subgrupo B			1	1
	Paenibacillus macerans subg B				1
	Microbacterium liquefaciens				1
	Paenibacillus gordonae			1	
	Paenibacillus macerans	2		1	1

"...continua..."

"TABELA 1, Cont."

	Bacillus sphaericus	2		3
	Bacillus marinus		1	
	Bacillus mycoides			1
	Subtotal	**5**	**15**	**16**
Gram negativa				
	Acinetobacter johsonii		1	1
	Tom 4		1	
	Pseudomonas putida	1		
	Tom 24			1
	Tom 30		1	
	Kocuria kristinae			1
	Tom 35			1
	Tom 38		1	
	Subtotal	**0**	**4**	**4**
	Total geral	**5**	**19**	**20**

Ziniel et al. (2002) obtiveram 52 isolados de bactérias endofíticas do milho e do sorgo e identificaram 15 gêneros, predominando *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Microbacterium*.

TABELA 2 Diversidade de gêneros e espécies de bactérias endofíticas isolados de hastes e folhas de tomateiro e pimentão e morfologia das colônias em meio TSA.

GÊNERO	ESPÉCIES / MORFOLOGIA DOS ISOLADOS	N.º isolados
Acinetobacter	*A. johnsonii* – bordos lisos, cor amarelada a creme, exceto para o isolado n° 10, de cor branca, 3-4 mm de diâmetro;	3
Bacillus	*B. amyloliquefaciens* – bordos enrugados com círculo branco no centro, bordos recortados, 0,5 a 3 cm de diâmetro;	7
	B. cereus – colônias brancas, bordo liso, 8-10 mm de diâmetro;	1
	B. megaterium – colônias translúcidas, bordos lisos e 3-4 mm de diâmetro;	1
	B. marinus – colônias amareladas, bordo liso, 3 mm de diâmetro;	1
	B. mycoides – colônias brancas, com círculos cremes no centro, bordos lisos, 8 mm de diâmetro;	1
	B. pumilus – colônias cor creme, amarelada ou branca, bordos recortados, 3-30 mm de diâmetro; entretanto, os isolados 6, 8, 27 e 39 apresentaram bordos lisos;	12
	B. sphaericus – colônias brancas, bordos lisos, 3-10 mm de diâmetro, porém, o isolado 43 apresentou bordo um pouco recortado.	5
	B. subtilis – colônias brancas, bordos lisos a recortados, 5-7 mm de diâmetro; porém, o isolado 31 apresentou colônia enrugada com crescimento para cima no centro;	2

"...continua..."

"TABELA 2,' Cont."

Curtobacterium	*C. luteum* – colônias cremes, bordos lisos, 3-4 mm de diâmetro;	1
Kocuria	*K. kristine* – colônia amarelada no centro em círculos e bordo branco, bordos lisos, 2-3 mm de diâmetro;	1
Microbacterium	*M. liquefaciens* – colônias com círculos alaranjados no centro e bordos brancos, bordos lisos, 2-3 mm de diâmetro;	1
Paenibacillus	*P. macerans* – colônias brancas com o centro alaranjado e, às vezes, toda alaranjada, com bordos lisos; porém, um isolado apresentou bordo recortado;	4
	P. gordonae – colônia branca a leitosa nos bordos com pequeno círculo no centro, bordo liso, 3-10 mm de diâmetro;	2
Pseudomonas	*P. putida* – colônias brancas com o centro amarelado, com bordos lisos, 4-5 mm de diâmetro;	1
Staphylococcus	*S. aureus* – colônias brancas, com bordos lisos, 4 mm de diâmetro;	1

Total = 8 gêneros, 16 espécies e 44 isolados. Com exceção do isolado n. 26 de *B. pumilus* que cresceu irregularmente, todos os demais apresentaram colônias circulares.

Em vagens de amendoim, Kloepper et al. (1992a) encontraram os gêneros *Acinetobacter*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*. Os mesmos autores encontraram, em vagens, raízes e solo de rizosfera do amendoim *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Em raízes de soja, mucuna e mamona, Kloepper et al. (1992b) encontraram *Acinetobacter*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* e *Pseudomonas*.

Yoshida et al. (2001), isolando de folhas sadias microrganismos antagonistas à antracnose da amora, encontraram *Bacillus amyloliquefaciens* como o mais forte.

5.2 Caracterização morfológica e fisiológica dos isolados endofíticos

As colônias das espécies de *Bacillus* apresentaram bordos de lisos a enrugados. Em *B. pumillus*, predominaram colônias com bordos enrugados, bem como nas espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Nos demais gêneros identificados ocorreram sempre colônias com bordos lisos (Tabela 2). A coloração das colônias variou de branca a amarelada, alaranjada ou creme. As espécies *B. pumillus* e *B. marinus* apresentaram colônias cremes e amareladas. *Acinetobacter johsonii* e *Curtobacterium luteum* apresentaram coloração creme. *Kocuria kristinae* e *Microbacterium liquefaciens* apresentaram colônias de alaranjadas a amareladas, em círculos com bordos brancos. *Paenibacillus macerans* apresentaram colônias brancas com o centro alaranjado e, às vezes, toda a colônia alaranjada. Colônias de *Pseudomonas putida* apresentaram coloração branca com o centro amarelado (Tabela 2).

Faria (2003), encontrou isolados suspeitos de serem *Bacillus* tendo colônias com bordos recortados como característica morfológica. Colônias de coloração amarelada foram encontradas por Centurion & Kimati (1994) e identificadas como do gênero *Bacillus*.

Os 53 isolados de bactérias endofíticas testados não demonstraram capacidade de produção de pigmentos fluorescentes (Tabela 3), o que confirma a identificação feita por ácidos graxos em que não se encontrou *Pseudomonas fluorescens*. Entretanto, foi identificada a espécie *Pseudomonas putida*, mas não foi verificada a produção de pigmentos fluorescentes característicos. Cerca de

82,00% dos isolados foram Gram positivos e o restante Gram negativos. Esta predominância de bactérias Gram positivas está correlacionada com a presença de *Bacillus* com 8 espécies identificadas e de uma espécie de *Curtobacterium luteum*, uma espécie de *Staphylococcus aureus*, uma espécie de *Microbacterium liquefaciens*, uma espécie de *Paenibacillus macerans* subgrupo B e uma espécie de *Paenibacillus gordonae Paenibacillus macerans*. As demais espécies, identificadas como *Acinetobacter johsonii, Pseudomonas putida* e *Kocuria kristine*, são Gram negativas.

TABELA 3 Caracterização parcial dos isolados bacterianos endofíticos obtidos de folhas e hastes de tomate e pimentão.

Planta hosp.	Isolado nº.	Identificação	Caracterização parcial				
			Solubilidade em KOH	Hidrolise de amido	Hidrolise de gelatina	Anaerobiose	Fluorescência em King B
Tomate							
	1	*Acinetobacter johnsonii*	-	+	+	-	-
	2	TOM 2*	+	+	+	+	-
	3	*Bacillus pumillus*	+	-	+	-	-
	4	Tom 4	-	-	-	+	-
	6	*Bacillus pumillus*	+	-	+	+	-
	7	*B. megaterium*	+	+	-	+	-
	8	*B. pumillus*	+	-	+	+	-
	9	*Acinetobacter johnsonii*	-	+	+	+	-
	10	*A. johsonii*	-	+	+	+	-
	21	*B. amyloliquefaciens*	+	+	-	+	-
	22	*B. amyloliquefaciens*	+	+	-	+	-
	23	Tom 23	+	+	-	+	-
	24	Tom 24	-	-	+	-	-
	25	Tom 25	+	+	+	+	-
	26	*B. pumillus subg. B*	+	+	+	+	-
	27	*B. pumillus subg. B*	+	-	+	-	-
	28	*B. amyloliquefaciens*	+	+	-	+	-

"...continua..."

"TABELA 3, Cont."

	29	*Paenibacillus macerans subg. B*	+	-	+	-	-
	31	*B. subtilis*	+	+	-	+	-
	32	*B. amyloliquefaciens*	+	+	+	+	-
	33	*Kocuria kristinae*	-	+	+	+	-
	34	*Microbacterium liquefaciens*	+	-	+	+	-
	35	Tom 35	-	+	+	+	-
	36	*B. amyloliquefaciens*	+	+	+	+	-
	37	*Paenibacillus gordonae*	-	+	+	+	-
	38	Tom 38	-	+	-	+	-
	39	*B. pumillus*	+	+	+	+	-
	40	*Paenibacillus gordonae*	+	-	+	+	-
	41	*B. amyloliquefaciens*	+	+	+	+	-
	42	*B. sphaericus*	+	-	+	+	-
	43	*B. sphaericus*	+	+	+	+	-
	44	*B. marinus*	+	+	+	+	-
	45	*B. sphaericus*	+	-	+	+	-
	46	*B. mycoides*	+	-	+	+	-
	47	*Paenibacillus macerans*	-	+	+	+	-
	48	*B. pumillus*	+	-	+	-	-

'...Continua..."

"TABELA 3, Cont."

	49	*B. pumillus*	+	+	+	+	-
	50	*B. amyloliquefaciens*	+	-	+	+	-
	51	*B. pumillus*	+	+	+	-	-
	52	*B. pumillus*	+	+	+	+	-
Pimentão							
	11	Pim 11	+	+	+	+	-
	12	*B. pumillus*	+	+	-	+	-
	13	*B. cereus*	+	+	+	+	-
	14	*Paenibacillus macerans*	-	+	-	+	-
	15	*Paenibacillus macerans*	-	+	+	+	-
	16	*Curtobacterium luteum*	+	+	+	+	-
	17	*Pseudomonas putida*	-	+	+	+	-
	18	*Staphylococcus aureus*	+	+	+	+	-
	19	*B. subtilis*	+	+	+	+	-
	20	*B. pumillus*	+	+	+	+	-
	53	*B. sphaericus*	+	+	+	+	-
	54	*B. sphaericus*	+	-	+	-	-

- resultado negativo; + resultado positivo; * espécie não identificada

A produção de amilase foi verificada em cerca de 71,15% dos isolados. A capacidade de crescer na ausência de O_2 foi demonstrada por 84,61% dos isolados. Esta capacidade relaciona-se, talvez, ao hábito de parasitismo, já que eles foram isolados de tecidos internos de folhas e hastes de tomateiro e pimentão, sendo, portanto, endofíticos. A capacidade de hidrolisar a gelatina foi demonstrada por 81,1% dos isolados.

Kobayashi & Palumbo (2000) isolaram tanto bactérias endofíticas Gram positivas como Gram negativas de muitas espécies de plantas, bem como diversas espécies bacterianas endofíticas de uma mesma planta.

Dentre as bactérias Gram positivas, as pertencentes ao gênero *Bacillus* têm se destacado como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Guo et al., 2004; Jetiyanon & Kloepper, 2002). Ishida (2004), ao fazer a caracterização fisiológica dos 4 isolados previamente selecionados para o controle da mancha angular do algodoeiro, verificou que três deles eram Gram positivos. Faria (2003) isolou 220 bactérias de lodo de esgoto e 66,8% delas eram Gram positivas.

Em outro levantamento, Kloepper et al. (1992a) encontraram 6,9% de rizobactérias (*Pseudomonas gladioli, Bacillus pumilus* e *Bacillus* sp.) capazes de hidrolisar a gelatina e 16,3% (*Pseudomonas cepacia, Bacilus megaterium, Clavibacter michiganense- 1707, 1761-* 1769, 1776, *Aureobacterium barkeri*) capazes de hidrolisar o amido. Kupper & Fernandes (2002) encontraram 94% dos isolados com capacidade de hidrolisar o amido. Neves et al. (2003) encontraram capacidade de hidrólise do amido e gelatina no isolado *Bacilus cereus*.

Ishida (2004) encontrou, em 4 isolados de rizobactérias previamente selecionados para o controle da mancha angular do algodoeiro, dois aeróbios estritos e dois anaeróbios facultativos.

6 CONCLUSÕES

Foram identificados 8 gêneros e 16 espécies de bactérias endofíticas entre 53 isolados obtidos.

O gênero *Bacillus* foi encontrado em maior freqüência, com 9 espécies.

A maioria dos isolados de bactérias endofíticas encontrados em haste e folhas de tomate e pimentão foi do tipo Gram positivos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; COELHO, R. S. B. Biocontrol on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Ed.). **Advances in biological control of plant diseases.** Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 3747-353.

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.

BELL, C. R.; DICKIE, G. A.; HARVEY, W. L. G.; CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 41, n. 1, p. 46-53, Jan. 1995.

CENTURION, M. A. P. C.; KIMATI, H. Seleção e identificação de microrganismos antagônicos a ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*) **Summa Phytopatologica,** Piracicaba, v. 20,n. 3/4, p. 174-178, jul./dez. 1994.

DE BOER, S. H.; SASSER, M. Differentiation of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroseptica* on the basis of fatty acid composition. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 3, n. 10, p. 796-800, Oct. 1986.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBEREDO, M. R.; CABALILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophytic of sugarcane stems. **Plant Physiology,** Rockville, v. 105, n. 4, p. 1139-1147, Oct. 1994.

FARIA, C. M. R. **Efeito do lodo de esgoto em nematóides de galhas.** 2003. 116 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FOSTER, R. C.; ROVIRA, A. D.; COCK, T. W. **Ultraestructure of the root-soil interface.** St. Paul: American Phytopathological society, 1983.

FROMMEL, M. I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and development modifications of 'in vitro' grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology,** Rockville, v. 96, n. 3, p. 928-936, July 1991.

GITAITIS, R. D.; BEAVER, R. W. Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 3, p. 318-321, Mar. 1990.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. Na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 699-703, out./dez. 2003.

GUO, J. H.; QI. , H. Y.; GUO, Y. H.; GE, H. L.; GONG, L. Y.; ZHANG, L. X.; SUN, P. H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 66-72, Jan. 2004.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, Oct. 1997a.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic simbiont of corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 129, n. 2, p. 117-125, 1995.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLEN-BERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 176, n. 7, p. 1913-1923. Apr. 1994.

ISHIDA, A. K. N. **Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro.** 2004. 130 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 275, p. 757-766, June 1994.

JANISIEWICZ, W. J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixture. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 2, p. 194-198, Feb. 1988.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, San Diego, v. 24, n. 3, p. 285-291, July 2002.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KLOEPPER, J. W.; MCINROY, J. A.; BOWEN, K. L. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarpophere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 139, n. 1, p. 75-84, Jan. 1992a.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KABANA, R.; MCINROY, J. A.; YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meliodogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 139, n. 1, p. 75-84, Jan. 1992b.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their affects on plants and uses in agriculture, p. 199-233. In: C. W. BACON; J. F. WHITE (Ed.). **Microbial endophytes.** New York: Marcel Dekker, 2000.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. Para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 292-295, jul./set. 2002.

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1112-1120, Nov. 1996.

MAHAFFEE, W. F.; BAUSKE, E. M.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER BRINK, M.; KLOPPER, J. W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescente colony staining and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a rhizobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1617-1622, Apr. 1997a.

MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER BRINK, M. Endophytic colonization of Phaseolus vulgaris by Pseudomonas fluorescens strain 89B-27 and Enterobacter asburiae strain JM22. In: RYDER, M. H.; STEPHENS, P. M.; BOWEN, G. D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria.** Melbourne: CSIRO, 1997b. p. 180.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Métodos de Coloração de bactérias. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia.** Recife: [S. n.], 2000. p. 115-119.

MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant Soil,** Dordrecht, v. 173, p. 337-342, 1995a.

MELO, R. A. G.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; COELHOR, R. S. B. Controle biológico da podridão mole do pimentão (*Capsicum annum* L.) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica,** Jaguariúna, v. 21, n 3/4, p. 206-212, jul./dez. 1995.

MELO, M. R. F.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T. R.; ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica,** São Paulo, v. 28, p. 222-228, abr./jun. 2002.

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 32, n. 5, p. 694-698, 1976.

NEVES, D. M. S.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA F. A. O.; MENDES, R. C. Caracterização parcial de um isolado de *Bacillus cereus*, agente de biocontrole de enfermidades do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 28, p. S379-S380, ago. 2003.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 24, n. 6, p. 734-742, 1978.

PHILIPSON, M. N.; BLAIR, I. D. Bacteria in clover root tissue. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 3, n. 2, p. 125-129, 1957.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interation with other palnt-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 43, n. 3, p. 254-259, Mar. 1997.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different

plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1144-1154, Nov. 1996.

REINHOLD, B.; HUREK, T. Location of diazotrophs in the interior with special attention to the kallar grass association. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 259-268, Aug. 1988.

RIZZO, A. F.; KORKEALA, H.; MONONEN, I. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosacchrides in the identification of lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 12, p. 2883-2888, Dec. 1987.

SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. Microflora within healthy tomatoes. **Applied Microbiology**, Washington, v. 9, n. 1, p. 20-25, 1961.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant Pathology bacteria**. St. Paul: APS Press, 2001. 373 p.

SHARROCK, K. R.; PARKES, S. L.; JACK, H. K.; REES-GEORGE, J.; HAWTHORNE, B. T. Involvemente of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* d. hybrid 'Delica'). **New Zealand Journal of Crop Horticultural Science**, Wellington, v. 19, n. 2, p. 157-165, 1991.

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

TREVET, I. W.; HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs of health palnts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 38, n, 10, p. 960-967, Oct. 1948.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 2, p. 181-187, Feb. 2001.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonization bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2198-2208, May 2002.

CAPÍTULO 3

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE E INIBIÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO DE *XANTHOMONAS VESICATORIA*, AGENTE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

1 RESUMO

SILVA, Juliana Resende Campos. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*, agente da mancha bacteriana do tomateiro In: **Bacterias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro.** 2004. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Foram selecionados 53 isolados endofíticos, em vários ensaios empregando-se o método de bacterização de sementes de tomate. As 5 melhores espécies endofíticas na redução da severidade da mancha bacteriana foram: *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, PIM 11(espécie não identificada) e *Paenibacillus gordonae*. As inoculações das espécies endofíticas antes da patogênica (Xv) proporcionaram sempre maiores reduções da severidade da mancha bacteriana do que a inoculação conjunta, tanto para as bactérias produtoras de halo de inibição *in vitro* como para aquelas que não produziram halo. Foram comparados diversos métodos de inoculação de bactérias endofíticas empregando-se *Bacillus pumillus* e *B. amyloliquefaciens* e a bactéria desafiante (*Xanthomonas vesicatoria* - Xv), destacando-se como os melhores a bacterização de sementes e irrigação da endofítica no solo. Dos 51 isolados de endofíticas testados contra a inibição de Xv *in vitro*. apenas 22 produziram halo, predominando o gênero *Bacillus* com 5 espécies: *B. pumilus*, *B. pumilus* subgrupo B, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, e 18 isolados. Os demais isolados pertencem às espécies *Pseudomonas putida* (3 isolados) e *Acinetobacter johnsonnii*. Todos esses isolados produziram halo de inibição com 12 horas de cultivo. Porém, *Acinetobacter johnsonnii* e *B. pumilus* produziram halo em 6 horas de cultivo.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador) e Édson Ampélio Pozza - UFLA

2 ABSTRACT

SILVA, Juliana Resende Campos. Control of bacterial spot of tomato with endophytic bacteria and in vitro antagonism studies of *Xanthomonas vesicatoria*. In: **Control of bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) and bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by endophytic bacteria.** 2004. 160 p. Dissertation (Master Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Using tomato seed bacterization method fifty three endophytic isolates were screened, in several assays in greenhouse. The five best endophytic bacteria species on the reduction of bacterial spot disease severity were: *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, PIM 11(non identified species), and *Paenibacillus gordonae*. The inoculation of endophytic species before the pathogenic (Xv) gave, always, greater reduction of disease severity of black spot than simultaneous inoculation, either for halo-producing endophytic as non-producing halo. Several methods of inoculation of endophytic bacteria were tested using *Bacillus pumilus* and *B. amyloliquefaciens* and the challenging bacterium *Xanthomonas vesicatoria* (Xv). Seed bacterization and inoculum irrigation onto the soil were the best methods. Among fifty one endophytic isolates tested against growth inhibition of Xv in vitro, only twenty two of them produced halo, predominating the genus *Bacillus* with five species: *B. pumilus*, *B. pumilus* subgroup B, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*; and eighteen isolates. The remaining isolates belonged to the species: *Pseudomonas putida* (3 isolates) and *Acinetobacter johnsonnii*. All those isolates produced inhibition halo within 12 hours of culturing. However, *Acinetobacter johnsonnii* and *B. pumilus* produced halo in six hours of culturing.

* Guindance Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Édson Ampélio Pozza - UFLA

3 INTRODUÇÃO

No Brasil, o tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) situa-se entre as hortaliças mais cultivadas, sendo produzido na maioria dos estados, porém, com baixa produtividade e alto custo de produção em relação a outros países (Lopes & Santos, 1994). Vários fatores têm contribuído, para que isso ocorra e entre eles estão as doenças, as quais chegam a limitar o seu cultivo em determinados locais e épocas do ano. As doenças bacterianas, particularmente, estão entre os principais problemas fitossanitários da cultura provocando perdas (Lopes & Quezado-Soares, 1997) de até 100 % em certos casos (Lopes, 2000). Entre essas bacterioses, destaca-se a mancha bacteriana, causada por ***Xanthomonas vesicatoria*** (Xv) (ex Doidge 1920) (Vauterin et al., 1995) (= *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*).

O controle para tal bacteriose tem sido amplamente pesquisado, contudo, devido ao rápido aumento da quantidade de inóculo e fácil disseminação, este controle em muitos casos, não tem eficiência, constituindo assim um problema sério e de difícil solução. Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido direcionadas para o controle biológico, o qual em muitos casos, tem se apresentado altamente promissor (Soares, 1993).

Segundo ROBBS (1991), o biocontrole pela introdução ou manejo de bactérias antagônicas nos locais de colonização do patógeno é um processo econômico e compatível com os recursos das comunidades agrícolas de baixa renda, não causando impactos no ambiente, nem efeitos tóxicos. Dentre as bactérias antagônicas que vêm demonstrando boa colonização no rizoplano ou sobrevivendo em saprogênese na rizosfera, estão espécies dos gêneros *Pseudomonas*, grupo fluorescente e *Bacillus*, os quais apresentam alto potencial para o controle biológico. No caso das rizobactérias e bactérias endofíticas, a

natureza saprofítica e a presença cosmopolita desses organismos, aliadas à possibilidade de aplicação via sementes ou mudas e sua capacidade de colonização das raízes e ou se escapar da competição com outros microrganismos da rizosfera, podem fazer desses organismos importantes agentes do controle biológico da mancha bacteriana do tomateiro, por meio da indução de resistência ou antibiose. A indução de resistência pode ser definida como um processo de defesa ativa da planta, em que esta utiliza múltiplos mecanismos induzidos sistemicamente por agentes bióticos e abióticos e que se apresentam eficientes contra uma variedade de patógenos de plantas (Luz, 1996). Plantas expostas a um agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (Sticher et al., 1997).

Outro aspecto do controle biológico é a inibição do crescimento de fitopatógenos por antibiose, uma característica altamente desejável. Em alguns casos, antibióticos de amplo espectro podem ser produzidos por um único antagonista.

Bactérias endofíticas no controle de bactérias fitopatogênicas têm sido pesquisadas por alguns pesquisadores (Colin & Chafik 1986; Van Buren et al., 1993; Liu et al., 1995a, 1995b, 1995c; Nascimento, 1998; Assis et al., 1998; Barreti, 2001). Entretanto, o controle de *X. vesicatoria* no Brasil tem sido pesquisado com apenas bactérias da rizosfera (Silva et al., 2004; Halfeld-Vieira et al., 2002) e por poucos pesquisadores. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, selecionar bactérias endofíticas isoladas de haste e folhas de tomateiro e pimentão com capacidade para controlar a mancha bacteriana do tomateiro e estudar a capacidade desses isolados em produzir metabólitos tóxicos a *Xanthomonas vesicatoria in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 53 isolados de bactérias endofíticas obtidos de hastes e folhas de tomate e pimentão e identificados pela análise de ácidos graxos em cromatógrafo a gás e armazenadas em deep freezer a -80°C até utilização nos ensaios.

4.1 Seleção de isolados bacterianos endofíticos de haste e folha de tomateiro e pimentão no controle da mancha bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas

A seleção entre os 53 isolados de bactérias endofíticas obtidos de caule e haste de tomateiro e pimentão e preservados em meio líquido peptona-glicerol em ultrafreezer a -80°C, para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, foi feita em 3 ensaios. Para tanto, os isolados foram transferidos para placas de petri contendo meio *trypic soy agar* (TSA) e incubados a 28°C em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões com esses isolados, adicionando-se às placas solução salina de $MgSO_4$ 0,1M e homogeneizando-se alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada em espectofotômetro para $T_{580nm} = 20\%$.

Para a microbiolização, sementes de tomateiro Santa Cruz Kadá foram desinfestadas superficialmente por meio de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e, em seguida, enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Após secagem sobre papel de filtro, as sementes foram imersas nas suspensões bacterianas por 24 horas. A testemunha foi imersa somente na solução salina. A seguir, as sementes bacterizadas foram deixadas por 2 horas para secar em papel de filtro e semeadas em bandejas contendo substrato

plantmax. O transplantio foi realizado 20 dias após a semeadura, deixando-se quatro plantas por vaso.

Aos 28 dias após a semeadura, realizou-se a inoculação das mudas por pulverização das folhas até o ponto de escorrimento, com suspensão de *Xanthomonas vesicatoria* na concentração de 10^8 ufc/mL (A_{540nm} = 0,03). As plantas permaneceram por 24 horas antes e 24 horas após a inoculação em câmara úmida, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Os primeiros sintomas foram observados cerca de 8 dias após a inoculação.

Os 53 isolados foram testados, inicialmente, em dois ensaios empregando-se 43 isolados no primeiro ensaio e 10 no segundo ensaio (Tabelas 2 e 3). Os 35 melhores isolados foram testados novamente em um único ensaio (Tabela 4).

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados, com 5 repetições.

Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação da bactéria desafiante (Xv), foram realizadas as avaliações da severidade da doença, seguindo-se a escala de Sidhu & Webster (1977). Esta avaliação seguiu um critério de notas variando de 0 a 4, em que: nota 0 = 0% da área foliar atacada; 1 = 25% ; 2 = 26% a 50%; 3 = 51% a 75% e nota 4 = mais de 75% da área foliar atacada. A altura até o coleto foi medida com régua graduada, nas mesmas datas anteriormente citadas.

Foi avaliada também neste ensaio a capacidade dos isolados em promover o crescimento da planta. Para isso, a altura do coleto até o ápice da folha mais alta foi medida.

Os dados foram analisados pelo programa SISVAR 4.2 e as médias comparadas pelo Teste Scott-Knott (1974).

4.2 Efeito da inoculação de bactérias endofíticas anterior e simultaneamente a *Xanthomonas vesicatoria*

Foram empregados quatro isolados não produtores de halo de inibição, *Bacillus sphericus* (isolados 53, 42, 43) e *Paenibacillus macerans* (isolado 37) e três isolados produtores de halo de inibição, *Bacillus megaterium* (isolado 7), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolados 22 e 36) classificados entre os 35 melhores isolados na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro (Tabela 4). Esses isolados foram cultivados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970). A concentração das suspensões das bactérias endofíticas foi ajustada em espectofotômetro para T_{580nm} = 20% e a da bactéria fitopatogênica foi de 10^8 ufc/mL (A_{540nm} = 0.03).

A inoculação de ambas as bactérias foi via pulverização de duas maneiras: bactéria endofítica anterior à fitopatogênica em 4 dias e simultaneamente.

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados, com 5 repetições. Aos sete, catorze dias após a inoculação da bactéria desafiante (Xv), foram realizadas as avaliações da severidade da doença, seguindo-se a escala de Sidhu & Webster (1977). Os dados foram analisados pelo programa SISVAR 4.2 e as médias comparadas pelo Teste Scott-Knott (1974).

4.3 Comparação entre métodos de inoculação de bactérias endofíticas para o controle da mancha bacteriana do tomateiro

Foram utilizados, neste ensaio, dois isolados de bactérias endofíticas, considerados promissores em ensaios anteriores, conforme tratamentos descritos na Tabela 1. Esses isolados foram transferidos para placas de petri contendo meio 523 (Kado & Heskett 1970) e incubados a 28°C em câmara de crescimento

(BOD). Após 48 horas, foram preparadas as suspensões bacterianas adicionando-se água e homogeneizando-se com a alça de Drigalsky.

TABELA 1 Métodos de inoculação de bactérias endofíticas em mudas de tomateiro.

TRATAMENTOS	
Irrigação do substrato (5 mL de suspensão)	
Bacillus pumillus	24 h antes da semeadura
Bacillus amyloliquefaciens	24 h antes da semeadura
Bacillus pumillus	7 dias após a germinação
Bacillus amyloliquefaciens	7 disas após a germinação
Bacterização das sementes	
Bacillus pumillus	24 h antes da semeadura
Bacillus amyloliquefaciens	24 h antes da semeadura
Bacillus pumillus	30 min antes da semeadura
Bacillus amyloliquefaciens	30 min antes da semeadura
Bacterização 24 h antes da semeadura + pulverização aérea	
Bacillus pumillus	
Bacillus amyloliquefaciens	
Pulverização aérea	
Bacillus pumillus	
Bacillus amyloliquefaciens	
Testemunha (pulverização apenas de Xv)	

A inoculação da bactéria desafiante Xv foi realizada quando as mudas apresentaram o segundo par de folhas definitivas e dois dias após, nos tratamentos de irrigação de substrato e pulverização da parte aérea.

A concentração das suspensões foi ajustada em espectofotômetro para T_{580nm}= 20%. A suspensão do patógeno Xv foi ajustada para concentração de 10^8 ufc/ml (A_{540nm}=0,03).

As plantas permaneceram por 24 horas antes e 24 horas após a inoculação em câmara úmida, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Os primeiros sintomas foram observados cerca de 8 dias após a inoculação.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados, com 13 tratamentos, 5 repetições com 4 plantas em cada vaso. Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação da bactéria desafiante Xv, foram realizadas as avaliações da severidade da doença, seguindo-se a escala de Sidhu & Webster (1977). Os dados foram analisados pelo programa SISVAR 4.2 e as médias comparadas pelo Teste Scott-Knott (1974).

4.4 Atividade antagonista *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos a *Xanthomonas vesicatoria*

Cinqüenta e três isolados bacterianos endofíticos foram cultivados em meio líquido 523 de Kado e Heskett por 24 horas a 28°C e transferidos para placas de petri com meio 523 sólido em 4 pontos eqüidistantes. Cada isolado endofítico foi semeado em 5 placas com alça de repicagem e incubados a 28°C/16 hs para Bacillus spp, e 24 horas para os demais gêneros, tempos estes suficientes para as colônias apresentarem crescimento evidente. Decorrido o tempo de incubação as placas foram invertidas, tendo sido colocado na tampa de cada uma, 1ml de clorofórmio, deixando-se por 30 minutos. As placas foram então entreabertas e deixadas por mais 30 minutos para a volatilização do

clorofórmio. Em seguida, cada placa recebeu uma sobrecamada de meio semi-sólido 523 fundente, ao qual foi incorporado 0,1 ml de suspensão da bactéria *Xanthomonas vesicatoria* e incubada a 28°C. Após 48 horas, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição formados.

4.5 Tempo de produção do halo de inibição ao crescimento de Xv por isolados bacterianos endofíticos

Foram empregados os isolados produtores de halo de inibição do crescimento de Xv com diâmetro superior a 3 cm. Dessa forma, foram selecionados 14 isolados pertencentes a 6 espécies. O cultivo dos isolados e a produção de bacteriocinas foram feitos conforme descrito anteriormente. A produção de bacteriocina foi avaliada às 6 e 12 horas após a repicagem de Xv, medindo-se o diâmetro do halo de inibição formado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de isolados bacterianos endofíticos de haste e folha de tomateiro e pimentão no controle da mancha bacteriana do tomateiro e promoção de crescimento das plantas

No primeiro experimento, a severidade da mancha bacteriana do tomateiro foi reduzida por todos os isolados endofíticos nas duas primeiras avaliações e por trinta deles na terceira avaliação (Tabela 2).

TABELA 2 Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) e porcentagem de controle em tomateiros provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Severidade (%)			% de controle		
	1ª Aval	2ª Aval.	3ª Aval	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval.
Bacillus pumilus (3)	13,17 a	30,67 a	33,62 a	70,90 a	53,99 a	53,26 a
B. cereus (13)	13,30 a	22,00 a	35,50 a	70,61 a	67,00 a	50,65 a
C. luteum (16)	13,90 a	29,95 a	35,50 a	69,28 a	55,07 a	50,65 a
B. pumilus (8)	14,35 a	29,80 a	38,30 a	68,28 a	55,30 a	46,76 a
B. amyloliquefaciens (32)	14,60 a	33,75 a	33,20 a	67,73 a	49,37 a	53,85 a
B. amyloliquefaciens (50)	15,15 a	39,55 a	42,25 a	66,52 a	40,67 a	41,27 a
Acinetobacter johnsonii (1)	15,85 a	31,00 a	35,05 a	64,97 a	53,50 a	51,28 a
B. amyloliquefaciens (41)	16,35 a	36,7 a	40,35 a	63,86 a	44,95 a	43,91 a
Tom 2	16,75 a	37,95 a	39,20 a	62,98 a	43,07 a	45,51 a
B. megaterium (7)	16,90 a	29,80 a	34,35 a	62,65 a	55,30 a	52,25 a

"...continua..."

"TABELA 2, Cont."

Pim 11	17,25 a	34,30 a	35,45 a	61,88 a	48,55 a	50,72 a
B. pumilus (20)	17,25 a	35,90 a	37,70 a	61,87 a	46,15 a	47,59 a
B. sphaericus (53)	17,35 a	34,00 a	37,85 a	61,65 a	49,00 a	47,38 a
B. amyloliquefaciens (36)	17,45 a	35,25 a	37,75 a	61,43 a	47,12 a	47,52 a
M. liquefaciens (34)	17,90 a	33,45 a	40,35 a	60,44 a	42,32 a	43,91 a
B. sphaericus (54)	17,95 a	36,40 a	42,45a	60,33 a	45,40 a	40,99 a
Tom 24	18,00 a	32,80 a	37,55 a	60,22 a	50,80 a	47,80 a
P. macerans (47)	18,00 a	34,65 a	46,80 b	60,22 a	48,02 a	34,94 b
B. amyloliquefaciens (22)	18,20 a	32,25 a	41,25 a	59,77 a	51,62 a	42,66 a
Tom 38	18,55 a	27,55 a	26,80 a	59,00 a	58,67 a	62,74 a
Tom 23	18,55a	31,85 a	30,15 a	59,00 a	52,22 a	58,09 a
B. pumilus (39)	18,65a	37,95 a	41,95 a	58,78 a	43,07 a	41,68 a
B. sphaericus (43)	19,10a	27,75 a	34,60 a	57,78 a	58,37 a	51,90 a
B. subtilis (31)	19,15a	38,45 a	39,55 a	57,67 a	42,32 a	45,02 a
B. amyloliquefaciens (21)	19,75a	30,60 a	46,50 b	56,35 a	54,10 a	35,36 b
B. sphaericus (45)	20,65a	27,80 a	29,85 a	54,36 a	58,30 a	58,50 a
Tom 4	20,74 a	34,35 a	55,20 b	54,14 a	48,47 a	23,27 b
B. pumilus (52)	20,95 a	39,55 a	54,50 b	53,70 a	40,67 a	24,24 b
P. macerans (37)	21,05 a	33,65 a	32,00 a	53,47 a	49,52 a	55,52 a
B. amyloliquefaciens (28)	21,10 a	41,15 a	44,70 b	53,36 a	23,27 a	37,86 b
B. pumilus (49)	21,15 a	32,80 a	43,65 b	53,25 a	50,80 a	39,32 b
B. subtilis (19)	21,35 a	38,05 a	35,65 a	52,81 a	42,92 a	50,44 a
Tom 25	21,45 a	29,60 a	46,80 b	52,60 a	35,60 a	34,95 b
P. macerans subg. B (29)	22,10 a	29,90 a	42,60 a	51,15 a	55,15 a	40,78 a
B. sphaericus (42)	22,10 a	34,65 a	37,35 a	51,15 a	48,02 a	48,08 a
A. johsonii (9)	22,55 a	36,30 a	45,35 b	50,16 a	45,55 a	36,96 b
B. pumilus (48)	22,65 a	40,25 a	54,65 b	49,94 a	39,62 a	24,03 b
Tom 30	22,70 a	35,55 a	53,70 b	49,83 a	46,67 a	25,35 b

"...continua..."

"TABELA 2, Cont."

P. putida (17)	22,90 a	42,90 a	44,05 b	49,39 a	35,65 a	38,77 b
S. aurens (18)	23,30 a	41,15 a	44,90 b	48,50 a	38,27 a	37,58 b
A. johsonii (10)	23,70 a	36,50 a	27,45 a	47,62 a	45,25 a	61,84 a
B. pumilus subg B (27)	23,78 a	33,65 a	37,10 a	47,51 a	49,52 a	48,43 a
Tom 35	24,80 a	42,90 a	46,10 b	45,19 a	35,65 a	35,92 b
Testemunha	45,25 b	66,50 b	71,70 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

No segundo ensaio, a severidade da mancha bacteriana foi reduzida por 5 isolados endofíticos em cada avaliação (Tabela 3). Entretanto, apenas as espécies *Kocuria kristinae* (isolado 33), *Paenibacillus gordonae* (isolado 40) e *Bacillus pumillus* (isolados 6 e 51) reduziram a severidade de *Xanthomonas vesicatoria* nas duas avaliações.

Na primeira série de seleção, 35 isolados de diferentes espécies foram os mais promissores na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro, os quais foram selecionados para o terceiro ensaio. Neste ensaio, cerca de 32, 31 e 34 isolados reduziram ($P<0,05$) a infecção de *Xanthomonas vesicatoria* comparados à testemunha, na primeira, segunda e terceira avaliações, respectivamente, em diferentes graus (Tabela 4). Entretanto, as espécies *Bacillus pumillus* (isolado 6) e *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 22) reduziram a severidade da mancha bacteriana nas três avaliações (Tabela 4), de forma superior a todos os outros isolados.

Tabela 3 Severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) e porcentagem de controle em tomateiros provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Severidade (%)		% de controle	
	1° Aval.	2° Aval.	1° Aval.	2° Aval.
K. kristinae (33)	25,75 a	43,75 a	38,97 a	23,00 a
P. gordonae (40)	27,5 a	46,50 a	34,82 a	18,16 a
P. macerans (14)	28,00 a	45,00 a	33,64 a	20,80 a
B. pumilus subg. B (26)	31,25 a	54,74 b	25,93 a	3,64 b
B. pumilus (6)	32,00 a	43,25 a	24,16 a	23,88 a
Pim 12	35,25 b	52,50 b	16,45 b	7,60 b
B. marinus (44)	35,50 b	48,25 a	15,86 b	15,08 a
B. pumilus (51)	37,25 b	58,75 b	11,71 b	3,40 b
P. macerans (15)	40,00 b	61,00 b	5,20 b	7,36 b
B. mycoides (46)	40,75 b	58,75 b	3,42 b	3,40 b
Testemunha	42,25 b	56,75 b	0,00 b	0,00 b.

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Os dez melhores isolados na primeira avaliação nem sempre mantiveram este bom desempenho na segunda e terceira avaliações. Entretanto, os menos eficientes na primeira avaliação permaneceram como tais na segunda e terceira avaliações. Os cinco melhores isolados quanto à redução da severidade da mancha bacteriana foram: *Bacillus pumillus* (isolado 6), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 22), *Bacillus megaterium* (isolado 7), isolado PIM 11 e *Paenibacillus gordonae* (isolado 40) (Tabela 4).

TABELA 4 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro na segunda seleção dos isolados promissores de bactérias endofíticas

ISOLADOS	SEVERIDADE		
	1 AVAL	2 AVAL	3 AVAL
Bacillus pumilus (6)	0,46 a	1,00 a	1,46 a
Bacillus sphaericus (42)	0,46 a	1,14 b	2,04 d
Bacillus sphaericus (43)	0,49 a	1,33 b	2,00 d
Bacillus sphaericus (53)	0,50 a	1,40 c	2,00 d
TOM 24	0,53 a	1,50 c	1,80 c
Bacillus amyloliquefaciens (22)	0,55 a	1,06 a	1,50 a
TOM 38	0,58 a	1,57 d	2,00 d
Bacillus megaterium (7)	0,60 a	1,22 b	1,90 c
Paenibacillus macerans (37)	0,61 a	1,40 c	1,70 b
PIM 11	0,62 a	0,86 a	1,90 c
Bacillus pumilus (20)	0,73 b	1,58 d	2,07 d
Paenibacillus macerans (14)	0,73 b	2,00 e	2,78 g
Bacillus sphaericus (45)	0,75 b	1,46 c	2,05 d
Microbacterium liquefaciens (34)	0,75 b	1,65 d	1,85 c
Paenibacillus gordonae (40)	0,77 b	1,27 b	1,86 c
Bacillus subtilis (19)	0,80 b	1,52 c	2,05 d
Bacillus pumilus (39)	0,85 b	1,43 c	1,85 c
Bacillus sphaericus (54)	0,85 b	1,21 b	2,23 e
Bacillus cereus (13)	0,89 c	1,69 d	2,18 e
Acinetobacter johnsonii (10)	0,93 c	1,73 d	2,23 e
Bacillus amyloliquefaciens (50)	0,98 c	1,63 d	1,96 d
Bacillus amyloliquefaciens (32)	0,99 c	1,72 d	2,27 e
Bacillus amyloliquefaciens (21)	1,00 c	1,93 e	2,36 e
Acinetobacter johnsonii (1)	1,36 c	1,86 e	2,16 e
Kocuria kristinae (33)	1,04 c	1,71 d	2,20 d
TOM 2	1,10 d	2,10 e	2,38 e
TOM 23	1,14 d	1,99 e	2,42 f
Paenibacillus macerans subg B (29)	1,30 e	2,00 e	2,26 e
Bacillus amyloliquefaciens (36)	1,31 e	1,85 e	2,20 e
Bacillus pumilus (3)	1,33 e	2,23 f	2,74 g
Bacillus pumilus subgrupo B (27)	1,35 e	2,13 e	2,53 f
Bacillus subtilis (31)	1,40 e	2,22 f	2,52 f
Curtobacterium luteum (16)	1,43 f	1,95 e	2,33 e
Bacillus amiloliquefaciens (41)	1,70 g	2,20 f	2,30 e
Bacillus pumilus (8)	2,30 h	2,60 g	3,00 h
TESTEMUNHA	1,45 f	2,36 f	2,90 h

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Scott-knott.

Silva et al. (2004) obtiveram redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro quando utilizaram a bactéria *Bacillus cereus*. Guo et al. (2004), obtiveram redução de 63,4% a 78,5% na severidade da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), quando usaram uma formulação contendo *Bacillus* sp, *Serratia* sp. e *Pseudomonas* sp.

Quarenta e dois dos 51 isolados no primeiro experimento promoveram ($P<0,05$) o crescimento do tomateiro, na primeira avaliação; 29 deles também reduziram a severidade da mancha bacteriana, nas três avaliações, em aproximadamente 60% (Tabela 5). Entretanto, nas segunda e terceira avaliações, não houve promoção do crescimento pelos isolados testados (Tabela 4).

TABELA 5 Altura das plantas de tomateiro provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Altura (cm)		
	1° Aval	2° Aval	3° Aval
Tom 3	24,30 a	25,25 a	26,43 a
B. cereus (13)	28,11 b	31,40 a	32,50 a
C. luteum (16)	29,80 c	31,80 b	33,55 b
B. pumilus (8)	29,25 b	32,48 b	34,91 b
B. amyloliquefaciens (32)	31,38 c	32,73 b	34,31 b
B. amyloliquefaciens (50)	34,30 c	36,65 b	37,30 b
Tom 1	29,80 c	31,95 b	33,15 b
B. amyloliquefaciens (41)	30,30 c	32,13 b	32,16 a
Tom 2	27,35 b	28,90 a	23,62 a
B. megaterium (7)	31,60 c	34,36 b	36,16 b
Pim 11	26,68 b	28,96 a	30,25
B. pumilus (20)	30,75 c	34,00 b	34,35 b

"...continua..."

"TABELA 5', Cont."

B. sphaericus (53)	31,25 b	32,15 b	34,05 b
B. amyloliquefaciens (36)	32,30 c	33,00 b	34,85 b
M. liquefaciens (34)	30,45 c	32,46 b	33,20 b
B. sphaericus (54)	30,60 c	32,05 b	33,30 b
Tom 24	33,85 c	36,85 b	37,95 b
P. macerans (47)	30,45 c	32,85 b	35,85 b
B. amyloliquefaciens (22)	31,60 c	33,10 b	34,85 b
Tom 38	30,45 c	32,83 b	35,11 b
Tom 23	32,10 c	33,90 b	35,65 b
B. pumilus (39)	33,80 c	35,10 b	37,55 b
B. sphaericus (43)	27,10 b	27,45 a	28,70 a
B. subtilis (31)	31,50 c	32,96 b	34,50 b
B. amyloliquefaciens (21)	32,10 c	32,95 b	34,01 b
B. sphaericus (45)	33,45 c	36,55 b	38,15 b
Tom 4	28,45 b	30,45 a	31,20 a
B. pumilus (52)	33,75 c	34,20 b	35,50 b
P. macerans (37)	28,10 b	29,10 a	30,75 a
B. amyloliquefaciens (28)	31,55 c	33,80 b	34,00 b
B. pumilus (49)	28,10 b	30,65 a	31,85 a
Pim 19	30,70 c	32,70 b	33,80 b
Tom 25	34,53 c	36,30 b	38,10 b
P. macerans subg. B (29)	32,25 c	36,35 b	37,86 b
B. sphaericus (42)	33,25 c	34,81 b	35,66 b
A. johsonii (9)	29,80 c	30,90 a	32,95 b
B. pumilus (48)	28,70 b	30,70 a	31,50 a
Tom 30	27,05 b	30,35 a	32,90 b
P. putida (17)	33,15 c	34,43 b	35,23 b
S. aurens (18)	26,88 b	28,48 a	29,36 a

"...continua..."

"TABELA 5, Cont."

A. johsonii (10)	31,90 c	35,45 b	34,86 b
Tom 27	29,25 b	31,95 b	32,35 a
Tom 35	31,35 c	33,85 b	34,51 b
Testemunha	22,30 a	32,66 b	36,61 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Scott-knott.

TABELA 6 - Altura das plantas de tomateiro provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

Isolados	Altura (cm)	
	1° Aval	2° Aval
K. kristinae (33)	42,20 b	44,40 b
P. gordonae (40)	44,70 b	46,11 b
P. macerans (14)	41,65 b	45,38 b
B. pumilus subg. B (26)	41,06 b	42,35 b
B. pumilus (6)	42,71 b	46,01 b
Pim 12	40,03 b	43,83 b
B. marinus (44)	42,30 b	45,30 b
B. pumilus (51)	45,15 b	49,26 b
B. pumilus (51)	45,15 b	49,26 b
P. macerans (15)	45,95 b	47,70 b
B. mycoides (46)	43,13 b	47,11 b
Testemunha	34,25 a	36,85 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Scott-knott.

No segundo experimento, todos os isolados testados promoveram ($P<0,05$) o crescimento do tomateiro em relação à testemunha (Tabela 6). Quatro deles também reduziram a severidade da mancha bacteriana em aproximadamente 21,39% na primeira avaliação e 21,46% na segunda (Tabela 6).

5.2 Efeito da inoculação dos isolados de bactérias endofíticas, anterior e simultaneamente à fitopatogênica

As inoculações dos isolados endofíticos antes da Xv proporcionaram sempre maiores reduções na severidade da mancha bacteriana do que as inoculações simultâneas (Tabela 7), tanto para as bactérias produtoras de halo de inibição *in vitro* para Xv quanto para as não produtoras (Tabela 9). Supõe-se que a capacidade de lise de Xv pelas células bacterianas endofíticas como *Bacillus megaterium* (isolado 7) e *Bacillus amyloliquefaciens* (isolados 22 e 36) não tenha sido suficiente para impedir que as colônias de Xv causassem a mancha bacteriana no tomateiro. De fato, a Xv explora com grande eficácia uma fonte de alimento que é a célula viva da planta, a qual não é explorada pela endofítica que usa apenas o nutriente dos espaços intercelulares (apoplastos). Portanto, para aumentar a eficácia das endofíticas na redução de doença por Xv, há necessidade de inoculação antecipada em alguns dias à da Xv para, assim, disparar o processo de indução de resistência da planta nas células sadias antes da colonização pela Xv. Este fato foi demonstrado por Bashan & Bashan (2002) trabalhando com *Azospirillum brasilense* (Ab) no controle da mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) em que a inoculação antecipada de Ab foi o único meio eficaz no controle dessa enfermidade.

TABELA 7 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro, proveniente da inoculação dos isolados de bactérias endofíticas anterior e simultaneamente à fitopatogênica.

ISOLADOS	Modo de inoculação	Severidade	
		1ª Aval	2ª Aval
Bacillus sphaericus (43)	A	0,55 a	1,66 b
Bacillus amyloliquefaciens (22)	A	0,69 a	1,56 b
Bacillus sphaericus (42)	A	0,72 a	1,87 b
Bacillus amyloliquefaciens (36)	S	0,99 b	1,66 b
Bacillus sphaericus (43)	S	1,00 b	1,79 b
Bacillus sphaericus (53)	A	1,05 b	1,05 a
Bacillus amyloliquefaciens (36)	A	1,07 b	1,59 b
Bacillus amyloliquefaciens (53)	S	1,08 b	1,64 b
Paenibacillus macerans (37)	A	1,11 b	2,18 c
Bacillus sphaericus (42)	S	1,11 b	1,88 b
Paenibacillus macerans (37)	S	1,12 b	1,40 a
Bacillus amyloliquefaciens (22)	S	1,15 b	2,08 c
Bacillus megaterium (7)	A	1,19 b	1,86 b
Bacillus megaterium (7)	S	1,62 c	2,04 c
TESTEMUNHA	-	1,72 c	2,80 d

A – ANTERIOR: inoculação da bactéria endofítica via pulverização, 4 dias antes da inoculação da bactéria fitopatogênica Xv

S – SIMULTÂNEAMENTE: inoculação da bactéria endofítica, juntamente com a bactéria fitopatogênica Xv, via pulverização

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Scott-knott.

5.3 Comparação entre métodos de inoculação de bactérias endofíticas para o controle da mancha bacteriana do tomateiro

Todos os métodos de inoculação testados foram eficientes no controle da mancha bacteriana do tomateiro, diferindo significativamente da testemunha (Tabela 8). Na última avaliação, plantas não tratadas com os isolados de bactérias endofíticas (testemunhas) apresentaram 67,5% da área foliar lesionada enquanto que para as inoculadas pelo método de irrigação do substrato esse número foi de 31,5% e para as tratadas por bacterização de sementes, 45% da

área foliar lesionada. Observou-se, ainda na última avaliação, maior ($P< 0,05$) severidade da mancha bacteriana em todos os tratamentos que receberam a endofítica em pulverização, tanto isoladamente quanto em associação com a bacterização de sementes.

Na irrigação do substrato antes da germinação e na bacterização de sementes por 30 minutos ou 24 horas antes da semeadura, *Bacillus pumillus* foi sempre melhor ($P< 0,05$) do que o *B. amyloliquefaciens* na redução da severidade da mancha bacteriana do tomateiro. Entretanto na pulverização, isolada ou em associação com a bacterização, a melhor eficácia do *B. pumillus* não foi comprovada. Dessa forma, o melhor meio de inoculação do *B. pumillus* foi por bacterização ou irrigação do solo (Tabela 8).

A eficácia de todos os métodos de inoculação, comparados à testemunha (Tabela 8), demonstra que a adaptação dessas bactérias em colonizar internamente as plantas propicia-lhes a capacidade de multiplicarem-se em ambiente com menor competição, como ocorreria no solo e, portanto, mesmo que o método não propicie penetração de grande volume da suspensão inoculante, provavelmente, devido à maior disponibilidade de alimento e falta de competição, as endofíticas exercem eficazmente seu papel na redução da severidade da doença. Entretanto, houve diferenças entre isolados e métodos de inoculação. A menor eficácia da inoculação por pulverização talvez se explique pelo menor número de locais de penetração na folha, comparados aos do sistema radicular. Bactérias endofíticas entram na planta principalmente pelas raízes (Kobayasti & Palumbo, 2000). Bashan & Bashan (2002) não encontraram efeito do *Azospirillum brasiliense* na redução da severidade da mancha bacteriana pequena do tomateiro quando inoculada após a patogênica e por isso, propuseram o uso de *A. brasilense* em programas preventivos do controle da doença.

TABELA 8 Severidade da mancha bacteriana do tomateiro proveniente de diferentes métodos de inoculação de bactérias endofíticas.

Tratamentos	Avaliações		
	1ª	2ª	3ª
Irrigação do substrato			
B. pumillus **24h antes da semeadura**	0,66 c	1,33 c	1,26 a
B. amyloliquefaciens **24h antes da semeadura**	0,69 c	1,22 b	1,64 b
B. pumillus **7 dias após a germinação**	0,49 b	1,16 b	1,69 b
B. amyloliquefaciens **7 dias após a germinação**	0,84 d	1,32 c	1,93 c
Bacterização das sementes			
B. pumillus **24h antes da semeadura**	0,75 c	1,11 b	1,82 c
B. amyloliquefaciens **24h antes da semeadura**	0,92 d	1,35 c	1,83 c
B. pumillus **30 min antes da semeadura**	0,74 c	1,19 b	1,38 a
B. amyloliquefaciens **30 min antes da semeadura**	0.85 d	1.43 d	1,87 c
Bacterização 24h antes da semeadura + Pulverização aérea			
B. pumillus	0,82 d	1,34 c	2,25 e
B. amyloliquefaciens	0,74 c	1,47 d	2,22 e
Pulverização aérea			
B. pumillus	0,89 d	1,36 c	2,06 d
B. amyloliquefaciens	0,34 a	0,83 a	2,02 d
Testemunha	1,09 e	1,49 d	2,70 f
CV	**10,82**	**6,83**	**6,18**

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Scott-knott.

5.4 Atividade antagonista *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos a *Xanthomonas vesicatoria*

De acordo com o diâmetro do halo de inibição, as espécies bacterianas foram classificadas em 4 grupos, sendo os grupos 1, 2, 3 e 4 constituídos, respectivamente, por produtores de halo de inibição entre 0,2 a 0,9cm, 1 a 1,9 cm, 2 a 2,9 cm e maior que 3,0 cm. O maior número de isolados produziu halo maior do que 3,00 cm, sendo classificados no grupo 4, na qual predominaram espécies do gênero *Bacillus*, com destaque para *B. amyloliquefaciens* (Tabela 9).

Dos 51 isolados endofíticos testados, 22 inibiram o crescimento de Xv *in vitro* (Tabela 9). Desses, apenas *B. subtilis* (isolado 31), *Pseudomonas putida* (isolado 17) e *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 21) não causaram halo de inibição em *Pseudomonas syringae pv. tomato*, em trabalho anterior (capítulo 4). Dos 22 isolados produtores de halo de inibição, *Bacillus pumillus* (isolado 6), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 22) e *Bacillus megaterium* (isolado 7) reduziram ($P<0,05$) também a severidade da mancha bacteriana do tomateiro (Tabela 4). Provavelmente, tais isolados têm ação antagonística, isto é, inibem o crescimento da *Xanthomonas vesicatoria* nos tecidos foliares do tomateiro. Por outro lado, os isolados PIM 11 e a espécie *Paenibacillus gordonae* (isolado 40) (Tabela 4) podem ter atuado apenas por indução de resistência nas plantas de tomate.

TABELA 9 – Agrupamento dos isolados bacterianos endofíticos de haste e folhas de pimentão e tomateiro quanto ao diâmetro do halo de inibição *in vitro* (cm) do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*.

Diâmetro do halo de inibição (cm)	Espécies e isolados de bactérias endofíticas
Grupo 1 (0,2 - 0,9)	*Bacillus pumillus* (isolados 6 e 8)
	Bacillus subtilis (isolado 31)
Grupo 2 (1,0 – 1,9)	*Pseudomonas putida* (isolado 17)
	Bacillus pumillus (isolado 39)
Grupo 3 (2,0 – 2,9)	*Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 21)
	Bacillus pumillus (isolados 48 e 52)
Grupo 4 (>3,0)	*Bacillus megaterium* (isolado 7)
	Acinetobacter johsonii (isolado 9)
	Bacillus pumillus subgrupo B (isolado 26)
	Bacillus pumillus (isolados 20, 49 e 51)
	Bacillus amyloliquefaciens (isolados 22, 28, 32, 36, 41 e 50)
	Pseudomonas putida (isolados 37 e 47)

Entretanto, a quantidade de inibidor presente no halo parece não ter relação com a eficácia do isolado endofítico em reduzir a severidade da mancha bacteriana, pois *Bacillus pumillus* (isolado 6), pertencente ao grupo 1, foi eficaz na redução da severidade da doença, bem como *B. megaterium* (isolado 7) e *B.*

amyloliquefaciens (isolado 22) (Tabela 9). Portanto, dois métodos de ação das bactérias endofíticas ocorreram entre os melhores isolados endofíticos aqui testados (Tabela 4). Guo et al. (2004) e Romeiro et al. (2000) também correlacionaram a inibição *in vitro* do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae pv tomato* com a redução da severidade da murcha e pinta bacteriana. Assis et al. (1998), estudando o potencial antagônico de bactérias endofíticas no controle da podridão negra em repolho *(Xanthomonas campestris* pv. *campestris)*, verificaram 70,8% e 77% de redução da severidade da doença em casa de vegetação e campo, respectivamente.

Substâncias produzidas *in vitro* por bactérias não patogênicas têm atuação não só contra bactérias fitopatogênicas, mas também contra outros microrganismos. Filtrados de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentaram efeito inibitório *in vitro* do crescimento de vários fungos e bactérias, tais como *Rosellinia nacatrix, Pyricularia oryzae, Agrobacterium tumefaciens* e *X. campestris* pv. *campestris* (Yoshida et al., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Hiradate et al. (2002) no controle de *Colletotrichum dematium* em amora e Kim & Chung (2004), trabalhando com *C. lagenarium* em melancia, indicando-os como bons candidatos ao biocontrole. Yu et al. (2002) também obtiveram sucesso no biocontrole de *Rhizoctonia solani* em soja com filtrados de *B. amyloliquefaciens* contendo iturin A, tanto em ensaios *in vitro* quanto em casa de vegetação. Marie et al. (1996) também obtiveram resultados positivos no controle de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de tomate com *Bacillus amyloliquefaciens*.

5.5 Tempo de produção do halo de inibição ao crescimento de Xv por isolados bacterianos endofíticos

Todas as espécies endofíticas testadas produziram halo com 12 horas de cultivo (Tabela 10). Entretanto, com 6 horas, apenas as espécies *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus pumillus* produziram halo inibindo o crescimento da *Xanthomonas vesicatoria*. O tamanho do halo produzido variou de 0,5 a 1,63 cm (Tabela 9). Os maiores halos foram produzidos pelas espécies *Bacillus amyloliquefaciens* e *Paenibacillus macerans*.

TABELA 10 Tempo para produção *in vitro* de bacteriocina por seis espécies bacterianas endofíticas e dimensão do halo de inibição do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*.

Espécies bacterianas	Tempo para produção de bacteriocina		Tamanho do halo produzido (cm)
	6h	12h	
Acinetobacter johsonii (Isol. 9)	+	+	0,60 / 060
Bacillus pumillus (Isol.49)	+	+	0,50 / 0,77
B. amyloliquefaciens (Isol. 22)	-	+	0,69
Bacillus pumillus (Isol. 51)	-	+	1,29
B. amyloliquefaciens (Isol. 41)	-	+	1,06
B. pumillus subgrupo B (Isol.26)	-	+	1,22
Bacillus megaterium (Isol. 7)	-	+	0,76

"...continua..."

"TABELA 10. Cont."

B. amyloliquefaciens (Isol. 28)	-	+	1,46
B. amyloliquefaciens (Isol. 32)	-	+	1,42
Paenibacillus gordonae (Isol. 40)	-	+	0,64
B. amyloliquefaciens (Isol.36)	-	+	1,63
Paenibacillus macerans (Isol. 37)	-	+	1,49
Bacillus pumillus (Isol. 20)	-	+	0,50
Paenibacillus macerans (Isol. 47)	-	+	0,85

+ resultado positivo - resultado negativo

A ausência do halo de inibição com 6 horas de cultivo (Tabela 8) talvez indique que a produção de bacteriocina só se inicia após a fase lag (latência ou adaptação) de crescimento bacteriano. Doze horas de cultivo parece ser o limite mínimo para se iniciar a produção de bacteriocina, pois o halo foi muito pequeno neste período (Tabela 9). Em ensaios anteriores cultivaram-se estas bactérias por 24 horas e os halos de inibição alcançaram tamanhos superiores a 3 cm (Tabela 9).

As espécies *Acinetobacter johsonii* (isolado 9) e *Bacillus pumillus* (isolado 41), produtoras de halo de inibição com 6 horas de cultivo, não produziram os maiores halos (Tabela 10). Dessa forma, a característica relativa ao tamanho do halo pode ser em função da toxicidade da substância ou solubilidade em água e não pela rapidez na sua produção

6 CONCLUSÕES

Bacillus pumilus, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, PIM 11(espécie não identificada) e *Paenibacillus gordanae* foram mais eficazes na redução da mancha bacteriana dentre os 53 isolados testados.

Maiores reduções da severidade da mancha bacteriana ocorreram quando a endofítica foi inoculada antes da Xv.

Apenas 43% dos isolados testados inibiram o crescimento de Xv *in vitro*.

Dos 51 isolados endofíticos testados *in vitro*, 22 inibiram o crescimento da *Xanthomonas vesicatoria*, em diferentes intensidades.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.

BARRETTI, P. B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencial para o biocontrole de enfermidades do tomateiro.** 2001. 38 p Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings againt infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 2637-2643, June 2002.

COLIN, J. E.; CHAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n. 11, p. 1048-1050, Nov. 1986.

GUO, J. H.; QI, H. Y.; GUO, Y. H.; GE, H. L.; GONG, L. Y.; ZHANG, L. X.; SUN, P. H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 66-72, Jan. 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MENDONÇA, H. L.; MIZUBUTI, E. S. G. Eficiência de bactérias do filoplano no controle biológico de doenças foliares do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 183-184, ago. 2002. Resumo.

HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 693-698, Nov. 2002.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KIM, P. I.; CHUNG, K. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 234, p. 177-183, 2004.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their affects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.). **Microbial endophytes.** New York: Marcel Dekker, 2000. p. 199-233.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promotiong rhizobacteria. **Phytopathology,** St. Paul, v. 85, n. 7, p. 843-847, July 1995a.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promotiong rhizobacteria. **Phytopathology,** St. Paul, v. 85, n. 6, p. 695-698, June 1995b.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promotiong rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection an root colonization. **Phytopathology,** St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1064-1068, Oct. 1995c.

LOPES, C. A. Bacterioses de hortaliças: situação atual e perspectivas de controle. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado de doenças, pragas e plantas daninhas.** Viçosa: UFV, 2000. p. 187-208.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças:** diagnose e controle. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1997. 70 p.

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

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** p. 1-49, 1996.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; BRUNELLI, M.; FOLCHI, A. Postharvest biological control of grey moul (*Botrytis cinerea*) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection,** Oxford, v. 15, n. 8, p. 699-705, Dec. 1996.

NASCIMENTO, A. S. **Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* do tomateiro.** 1998. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.

ROBBS, C. F. C Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de plantas.** Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 121-133.

ROMEIRO, R. de S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G.; de, CARRIER, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopatologica,** São Paulo, v. 26. n. 2. p. 220-224, Abr./jun. 2000.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, London, v. 30. p. 507-512, 1974.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology,** London, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1977.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacteral induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control,** San Diego, v. 29, n. 2, p. 288-298, Feb. 2004.

SOARES, F. M. P. **Métodos para detecção em sementes de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) e controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST).** 1993. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricuiltura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

STICHER, I.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

VAN BUREN, A. M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C. A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology,** St. Paul, v. 83, p. 1406, 1993.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 472-489, 1995

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology,** St. Paul, v. 91, n. 2, p. 181-187, 2001.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 955-963, July 2002.

CAPÍTULO 4

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE E INIBIÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV *TOMATO* ,AGENTE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO

1 RESUMO

SILVA, Juliana Resende Campos. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* do crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. In: Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro. Lavras: UFLA, 2004. 160 p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).*

Para avaliar o potencial de 53 isolados de bactérias endofíticas no controle da pinta bacteriana do tomateiro, realizaram-se seleções massais em casa de vegetação e a seguir foi avaliado, *in vitro*, o antagonismo desses isolados sobre a bactéria desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). A inoculação das bactérias endofíticas foi feita por microbiolização das sementes de tomate cv. Santa Clara e da desafiante (Pst) por pulverização. Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação da Pst, foram realizadas as avaliações da severidade da pinta bacteriana, bem como da altura das plantas. As espécies e os isolados bacterianos mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana foram: *Acinetobacter johsonii* (isolado 10), *Bacillus pumillus* (isolados 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolados 37 e 47), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolado 45), *B. amyloliquefaciens* (isolado 50), TOM 2, TOM 24 e *Staphylococcus aureus* (isolado 18). Mais de 50% dos isolados eficazes na redução da severidade foram da espécie *Bacillus pumillus*. Das espécies endofíticas mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana, *Bacillus pumillus* e *B. amyloliquefaciens* inibiram também o crescimento da Pst *in vitro*. Vários dos isolados promoveram também o crescimento das plantas.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador) e Édson Ampélio Pozza - UFLA

2 ABSTRACT

SILVA, Juliana Resende Campos. Control of bacterial speck of tomato with endophytic bacteria and in vitro inhibition. In: Control of bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) and bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by endophytic bacteria. Lavras: UFLA, 2004. 160 p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

To asses the potential of fifty three isolates of endophytic bacteria on the control of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) in tomato, several screening were done in greenhouse followed by the *in vitro* studies on antagonism of those isolates to Pst. The inoculation of endophytic bacteria was done by microbiolization of tomato cv Santa Clara seeds. The challenging bacterium (Pst) inoculation was done by spraying. At 7, 14 and 21 days after Pst inoculation the assessment of bacterial speck severity was done, and height of plants measured, as well. The most efficient endophytic species and isolates in reducing disease severity were: *Acinetobacter johsonii* (isolate 10), *Bacillus pumillus* (isolates, 3, 12, 20, 39, 51). *Paenibacillus macerans* (isolates, 37, 47), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolate 45), *B. amyloliquefaciens* (isolate 50), TOM 2 , TOM 24 and *Staphylococcus aureus* (isolate 18). More than 50% of the endophytic isolates efficient in reducing disease severity belonged to *Bacillus pumillus*. From the most efficient endophytic species group, the species *Bacillus pumillus* and *B. amyloliquefaciens* inhibited the Pst growth *in vitro*. Several bacterial isolates promoted growth of tomato.

* Guindance Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Édson Ampélio Pozza - UFLA

bacteriana do tomateiro com a aplicação do isolado UFV-101 em folhas por atomização.

Como ainda são escassas as pesquisas relativas ao controle biológico da pinta bacteriana do tomateiro, a busca por isolados bacterianos endofíticos continua, com o objetivo de obter agentes potenciais mais eficazes ao controle dessa enfermidade. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho selecionar isolados de bactérias endofíticas de diferentes espécies e gêneros obtidas de folhas e haste de tomateiro e pimentão no controle da pinta bacteriana do tomateiro e estudar a capacidade desses isolados em produzir metabólitos tóxicos a Pst *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se diversas espécies e gêneros de bactérias endofíticas isoladas de hastes e folhas de tomate e pimentão, identificadas pela análise de ácidos graxos em cromatógrafo a gás e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a utilização nos ensaios.

4.1 Seleção, em casa de vegetação de bactérias endofíticas para o controle da pinta bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas

Cinqüenta e três isolados de bactérias endofíticas (Tabela 1), preservados em meio líquido peptona-glicerol em ultrafreezer a –80 °C, foram transferidos para placas de Petri contendo meio "trypic soy agar" (TSA) e incubados a 28°C em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões com esses isolados, adicionando-se às placas solução salina de $MgSO_4$ 0,1M e homogeneizando-se com auxílio de alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada em espectofotômetro para T_{580nm} = 20%.

Para a microbiolização, sementes de tomateiro Santa Cruz Kadá foram desinfestadas superficialmente por meio de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e, em seguida, enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Após secagem sobre papel de filtro, as sementes foram imersas nas suspensões bacterianas por 24 horas. A testemunha foi imersa somente na solução salina. A seguir, as sementes bacterizadas foram deixadas por 2 horas para secar em papel de filtro e semeadas em bandejas contendo substrato plantmax. O transplantio foi realizado 20 dias após a semeadura, deixando-se 4 plantas por vaso.

TABELA 1 Isolados bacterianos endofíticos obtidos de haste e folhas de pimentão e tomateiro

ISOLADO Nº	CULTURA	ESPÉCIE IDENTIFICADA
1	Tomate	*Acinetobacter johnsonii*
2	Tomate	-
3	Tomate	*Bacillus pumilus*
4	Tomate	*Pseudomonas fluorescens*
5	—	-
6	Tomate	*Bacillus pumilus*
7	Tomate	*B. megaterium*
8	Tomate	*B. pumilus*
9	Tomate	*Acinetobacter johnsonii*
10	Tomate	*Acinetobacter johnsonii*
11	Pimentão	-
12	Pimentão	*B. pumilus*
13	Pimentão	*B. cereus*
14	Pimentão	*Paenibacillus macerans*
15	Pimentão	*P. macerans*
16	Pimentão	*Curtobacterium luteum (Brevibacterium luteum)*
17	Pimentão	*Pseudomonas putida*
18	Pimentão	*Staphylococcus aureus*
19	Pimentão	*Bacillus subtieis*
20	Pimentão	*B. pumilus*
21	Tomate	*Bacillus amyloliquefaciens*
22	Tomate	*B. amyloliquefaciens*
23	Tomate	-
24	Tomate	-
25	Tomate	-
26	Tomate	*Bacillus pumilus* subgrupo B
27	Tomate	*B. pumilus* subgrupo B
28	Tomate	*B. amyloquefaciens*
29	Tomate	*Paenibacillus macerans* subgrupo B
30	Tomate	-
31	Tomate	*Bacillus subtilis*
32	Tomate	*B. amyloliquefaciens*
33	Tomate	*Kocuria kristinae*
34	Tomate	*Microbacterium liquefaciens (Aureobacterium liquefaciens)*
35	Tomate	-

"...continua..."

"TABELA 1, Cont."

36	Tomate	*Bacillus amyloliquefaciens*
37	Tomate	*Paenibacillus macerans*
38	Tomate	-
39	Tomate	*B. pumilus*
40	Tomate	*Paenibacillus gordonae*
41	Tomate	*Bacillus amyloliquefaciens*
42	Tomate	*B. sphaericus*
43	Tomate	*B. sphaericus*
44	Tomate	*B. marinus*
45	Tomate	*B. sphaericus*
46	Tomate	*B. mycoides*
47	Tomate	*Paenibacillus macerans*
48	Tomate	*Bacillus pumilus*
49	Tomate	*B. pumilus*
50	Tomate	*B. amyloliquefaciens*
51	Tomate	*B. pumilus*
52	Tomate	*B.pumilus*
53	Pimentão	*Bacillus sphaericus*
54	Pimentão	*B. sphaericus*

Aos 28 dias após a semeadura, realizou-se a inoculação das mudas por pulverização das folhas até o ponto de escorrimento, com suspensão de *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Pst) na concentração de 10^8 ufc/mL (A_{540nm} = 0.2). As plantas permaneceram por 24 horas antes e 24 horas após a inoculação em câmara úmida, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Os primeiros sintomas foram observados cerca de 8 dias após a inoculação.

Cinqüenta e um isolados foram testados em três ensaios empregando-se 19, 18 e 14 isolados, respectivamente (Tabelas 2, 3 e 4), conduzidos em casa de vegetação em delineamento de bloco casualizados, com cinco repetições. Os 27 melhores isolados e espécies foram testados novamente em um único ensaio (Tabela 5). Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação da bactéria desafiante (Pst),

foram realizadas as avaliações da severidade da doença, seguindo-se a escala de Sidhu & Webster (1977).

Avaliou-se também a promoção do crescimento das plantas medindo-se a altura até o coleto com uma régua graduada nas mesmas datas anteriormente citadas.

Os dados foram analisados pelo programa SISVAR 4.2 e as médias comparadas pelo Teste Scott-Knott (1974).

4.2 Atividade antagonista *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)

Cinqüenta e três isolados bacterianos endofíticos foram cultivados em meio líquido 523 de Kado & Heskett (1970), por 24 horas a 28°C. Placas de petri com meio 523 sólido foram preparadas e semeadas com as bactérias endofíticas em quatro pontos eqüidistantes. Cada isolado endofítico foi semeado em cinco placas com o auxílio de uma alça de repicagem e incubado a 28°C/16h para Bacillus sp. e por 24 horas para os demais gêneros, tempos estes suficientes para as colônias apresentarem crescimento evidente. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram invertidas sendo colocado na tampa de cada uma 1ml de clorofórmio deixando-se por 30 minutos. As placas foram então entreabertas e deixadas por mais 30 minutos para a volatilização do clorofórmio. Em seguida, cada placa recebeu uma sobrecamada de meio semi-sólido 523 fundente, ao qual foi incorporado 0,1 ml de suspensão da bactéria Pst e incubadas a 28°C. Após 48 horas, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição do crescimento de Pst pelos 53 isolados bacterianos endofíticos testados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção, em casa de vegetação, de bactérias endofíticas para o controle da pinta bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas

Primeira seleção massal

No primeiro ensaio, na primeira avaliação feita sete dias após a inoculação da Pst, observou-se que doze isolados endofíticos reduziram significativamente a severidade da pinta bacteriana. A segunda avaliação, feita quatorze dias após a inoculação da Pst, demonstrou significativa redução na severidade da pinta bacteriana pelas espécies *Acinetobacter johnsonii* (isolados 1 e 10), *Paenibacillus macerans* (isolados 15 e 37), *Bacillus pumillus* (isolados 3, 6, 12, 20, 27 e 39), *B. amyloliquefaciens* (isolado 36), *B. megaterium* (isolado 7) em relação à testemunha. A porcentagem de controle variou de 26,74% a 41,09% em relação à testemunha (Tabela 2). No segundo ensaio, os melhores isolados foram selecionados na 1ª, na 2ª e na 3ª avaliações. Dessa forma, os melhores tratamentos foram PIM 11, *Paenibacillus macerans* (isolado 47), *Bacillus sphaericus* (isolados 42 e 45), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 50). A porcentagem de controle variou entre 34,6% e 44,6% (Tabela 3). No terceiro ensaio, os melhores isolados foram selecionados quando a severidade foi diferente ($P<0,05$) da testemunha nas três avaliações. Dessa forma, os melhores foram *Paenibacillus macerans* (isolado 29), *Microbacterium liquefaciens* (*Aureobacterium liquefaciens*) (isolado 34), TOM (isolados 2, 23, 24 e 25), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 28) e *Bacillus pumillus* (isolado 51), *B. sphaericus* (isolado 43), *Staphylococcus aurus* (isolado 18) (Tabela 4). Nos 3 ensaios, destacaram-se 27 isolados em que a severidade da pinta bacteriana foi menor ($P<0,05$) do que a testemunha dentro do critério descrito (Tabelas 2, 3, 4).

TABELA 2 1° ensaio: severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) em tomateiros provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

ISOLADOS	SEVERIDADE (%)		% DE CONTROLE	
	1ª Aval	2ª Aval	1ª Aval	2ª Aval
Acinetobacter johsonii (10)	14,20 a	17,85 a	33,26 a	41,09 a
B. pumilus (12)	11,45 a	18,00 a	46,18 a	40,60 a
Paenibacillus macerans (37)	22,40 b	18,55 a	0,00 b	38,78 a
B. pumilus (39)	27,15 c	18,65 a	0,00 c	38,45 a
B. pumilus (20)	15,00 a	18,75 a	29,50 a	38,12 a
Acinetobacter johnsonii (1)	15,00 a	18,90 a	29,50 a	37,63 a
Paenibacillus macerans (15)	17,75 a	19,30 a	16,57 a	36,31 a
B. amyloliquefaciens (36)	26,95 c	19,45 a	0,00 c	35,81 a
B. pumilus (3)	14,30 a	20,20 a	32,79 a	33,34 a
B. pumilus (6)	12,80 a	20,35 a	39,84 a	32,84 a
B. pumilus subg. B (27)	12,85 a	22,00 a	39,60 a	27,40 a
B. megaterium (7)	16,80 a	22,20 a	21,04 a	26,74 a
Tom 4	16,25 a	23,10 b	23,62 a	23,77 b
B. pumilus (8)	14,20 a	23,70 b	33,26 a	21,79 b
Paenibacillus macerans (14)	20,95 b	24,30 b	1,53 b	19,81 b
Pseudomonas putida (17)	19,95 b	24,35 b	6,23 b	19,64 b
B. amyloliquefaciens (21)	24,90 c	24,50 b	0,00 c	19,15 b
Acinetobacter johnsonii (9)	16,10 a	25,35 b	24,33 a	16,34 b
Bacillus pumilus subg. B (26)	24,40 c	26,10 b	0,00 c	13,87 b
Testemunha	21,25 b	29,95 b	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 3 2° ensaio: severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) em tomateiros provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

ISOLADOS	SEVERIDADE (%)			% DE CONTROLE		
	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
Pim 11	9,70 a	11,60 a	14,20 a	49,26 a	30,16 a	44,33 a
B. cereus (13)	10,20 a	15,82 b	19,90 b	53,34 a	4,76 b	21,99 b
P. macerans (47)	10,97 a	15,80 b	14,12 a	42,62 a	4,88 b	44,64 a
B. sphaericus (45)	11,02 a	16,47 b	14,92 a	42,36 a	0,85 b	41,51 a
B. sphaericus (42)	11,40 a	14,45 b	15,20 a	40,37 a	13,01 b	40,41 a
B. pumilus (48)	11,60 a	13,40 a	20,65 b	39,33 a	19,33 a	19,05 b
B. amyloliquefaciens (50)	12,40 a	13,15 a	16,67 a	35,14 a	20,83 a	34,65 a
B. subtilis (31)	13,92 a	15,55 b	26,52 b	27,19 a	6,38 b	3,95 b
B. amyloliquefaciens (41)	14,32 b	18,75 c	23,25 b	25,10 b	12,87 c	8,86 b
B. pumilus (52)	15,10 b	15,70 b	22,82 b	21,02 b	5,48 b	10,54 b
B. amyloliquefaciens (32)	15,35 b	16,77 b	17,10 a	19,71 b	0,95 b	32,96 a
B. sphaericus (54)	15,65 b	15,72 b	21,20 b	18,15 b	5,36 b	16,89 b
Pim 19	16,45 b	16,27 b	23,52 b	13,96 b	20,50 b	7,80 b
B. sphaericus (53)	16,65 b	21,62 d	23,65 b	12,92 b	0,00 d	7,40 b
Tom 35	17,40 c	15,10 b	22,30 b	8,99 c	9,09 b	12,58 b
B. pumilus (49)	18,12 c	22,30 d	25,40 b	5,23 c	0,00 d	0,43 b
C. luteum (16)	18,06 c	19,95 c	25,97 b	5,54 c	0,00 c	0,00 b
Tom 38	19,75 c	18,75 c	24,17 b	3,29 c	0,00 c	5,25 b
Testemunha	19,10 c	16,60 b	25,50 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 4 3° ensaio: severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) em tomateiros provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

ISOLADOS	SEVERIDADE (%)			% DE CONTROLE		
	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
P. macerans subg B (29)	11,57 a	22,40 a	19,20 a	51,63 a	40,64 a	42,78 a
M. liquefaciens (34)	12,42 a	23,90 a	20,90 a	48,08 a	36,66 a	37,71 a
Tom 2	13,10 a	23,65 a	21,30 a	45,24 a	37,32 a	36,52 a
S. aurens (18)	13,32 a	24,32 a	21,02 a	44,32 a	35,55 a	37,36 a
B. sphaericus (43)	14,27 a	21,32 a	18,20 a	40,35 a	43,50 a	45,76 a
Tom 23	14,27 a	24,30 a	20,42 a	40,35 a	35,60 a	30,14 a
Tom 25	14,30 a	23,40 a	20,42 a	40,22 a	37,99 a	39,14 a
Tom 24	14,85 a	16,97 a	18,80 a	37,92 a	55,02 a	43,97 a
B. amyloliquefaciens (28)	15,00 a	23,65 a	18,67 a	37,30 a	37,32 a	44,36 a
B. pumilus (51)	15,05 a b	24,10 a	20,15 a	37,09 a	36,13 a	39,95 a
K. kritinae (33)	18,27 b	27,70 a	21,75 a	23,63 b	26,59 a	35,18 a
B. amyloliquefaciens (22)	18,87 b	22,22 a	19,82 a	21,12 b	41,11 a	40,93 a
B. marinus (44)	20,82 b	23,47 a	20,27 a	12,97 b	37,80 a	39,59 a
P. gordonae (40)	21,12 b	24,95 a	21,25 a	11,71 b	33,88 a	36,67 a
Testemunha	23,87 b	37,67 a	33,47 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

A altura das plantas foi afetada pela inoculação de algumas bactérias endofíticas. No primeiro ensaio, maior promoção de crescimento ocorreu quando o isolado 10 de *Acinetobacter johnsonii* foi inoculado no tomateiro. Entretanto, na primeira avaliação da altura, três isolados bacterianos, *Acinetobacter johnsonii* (10), TOM 4 e *B. pumilus* (39), promoveram ($P< 0,05$) o crescimento (Tabela 6). Nem todos os isolados que promoveram crescimento

das plantas de tomateiro reduziram também a severidade da pinta bacteriana. O isolado TOM4 promoveu o crescimento, porém, num primeiro ensaio, não afetou a severidade da pinta bacteriana, necessitando, contudo, uma melhor investigação. Dois dos doze isolados que reduziram a severidade da doença também promoveram o crescimento das plantas em aproximadamente 9,5% para *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10) e 20,2% para *B. pumilus* (isolado 39) (Tabela 6).

TABELA 6 Altura das plantas de tomateiro provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

ISOLADOS	ALTURA (cm)	
	1ª Avaliação	2ª Avaliação
Acinetobacter johsonii (10)	19,00 a	24,70 a
B. pumilus (12)	17,80 b	24,15 a
Paenibacillus macerans (37)	14,35 c	21,55 b
B. pumilus (39)	20,85 a	23,70 a
B. pumilus (20)	16,80 b	23,35 a
Acinetobacter johnsonii (1)	13,45 c	20,85 b
Paenibacillus macerans (15)	16,05 c	21,90 b
B. amyloliquefaciens (36)	15,60 c	22,25 b
B. pumilus (3)	15,90 c	22,30 b
B. pumilus (6)	14,70 c	20,85 b
B. pumilus subg. B (27)	16,55 b	22,00 b
B. megaterium (7)	14,45 c	20,30 b
Tom 4	18,95 a	24,25 a
B. pumilus (8)	15,15 c	22,20 b
Paenibacillus macerans (14)	15,65 c	23,15 a
Pseudomonas putida (17)	16,45 b	21,70 b
B. amyloliquefaciens (21)	15,00 c	21,35 b
Acinetobacter johnsonii (9)	18,00 b	24,40 a
Bacillus pumilus subg. B (26)	16,70 b	23,25 a
Testemunha	17,35 b	23,30 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

No segundo ensaio, na primeira e segunda avaliações da altura, todos os isolados bacterianos utilizados promoveram o crescimento das plantas de tomateiro. Já na terceira avaliação, apenas 6 isolados dos 18 utilizados promoveram o crescimento das plantas, entre os quais 3 isolados, Pim 11, *B. cerens* (13) e *B. sphaericus* (45), promoveram o crescimento das plantas e, concomitantemente, reduziram a severidade da doença em 44,33%, 21,99% e 41,51%, respectivamente (Tabela 7).

TABELA 7 Altura das plantas de tomateiro provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

ISOLADOS	ALTURA (cm)		
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
Pim 11	26,10 c	36,70 c	50,30 b
B. cereus (13)	27,80 c	39,30 c	54,40 b
P. macerans (47)	23,33 b	31,53 b	42,19 a
B. sphaericus (45)	27,00 c	37,40 c	50,00 b
B. sphaericus (42)	24,49 b	34,24 b	46,26 a
B. pumilus (48)	26,30 c	35,90 c	44,85 a
B. amyloliquefaciens (50)	24,65 b	33,80 b	45,50 a
Tom 31	24,33 b	32,06 b	40,26 a
B. amyloliquefaciens (41)	22,99 b	32,93 b	49,29 b
B. pumilus (52)	27,10 c	36,80 c	46,60 a
B. amyloliquefaciens (32)	26,80 c	34,70 b	43,60 a
B. sphaericus (54)	26,00 c	35,80 c	52,40 b
Pim 19	23,90 b	33,80 b	46,20 a
B. sphaericus (53)	26,80 c	33,60 b	42,74 a
Tom 35	27,00 c	37,10 c	48,90 b
B. pumilus (49)	26,05 c	33,80 b	41,20 a
C. luteum (16)	23,36 b	32,11 b	40,48 a
Tom 38	27,70 c	35,55 c	44,33 a
Testemunha	17,40 a	25,15 a	36,33 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

No terceiro ensaio, a altura das plantas não diferiu entre os isolados testados e a testemunha (Tabela 8).

TABELA 8 Altura das plantas de tomateiro provenientes de sementes bacterizadas por diferentes isolados de bactérias endofíticas.

ISOLADOS	ALTURA (cm)		
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
P. macerans subg B (29)	21,40 a	33,11 a	39,29 a
M. liquefaciens (34)	20,25 a	30,85 a	36,00 a
Tom 2	20,96 a	31,56 a	37,73 a
S. aurens (18)	19,40 a	34,00 a	40,00 a
B. sphaericus (43)	22,50 a	32,65 a	36,90 a
Tom 23	21,48 a	32,30 a	36,88 a
Tom 25	21,11 a	31,21 a	36,76 a
Tom 24	22,75 a	34,43 a	39,10 a
B. amyloliquefaciens (28)	19,60 a	31,61 a	37,40 a
B. pumilus (51)	21,65 a	31,75 a	37,00 a
K. kritinae (33)	23,50 a	34,15 a	39,15 a
B. amyloliquefaciens (22)	22,10 a	32,05 a	36,40 a
B. marinus (44)	20,73 a	30,55 a	35,40 a
P. gordonae (40)	21,95 a	31,18 a	36,31 a
Testemunha	21,70 a	29,73 a	34,03 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Segunda seleção massal

Dos 27 isolados endofíticos selecionados anteriormente, apenas 14 reduziram a severidade da pinta bacteriana P(<0,05) em relação à testemunha nas 2ª e 3ª avaliações: *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10), *Bacillus pumillus* (isolados 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolados 37 e 47), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolado 45), *B. amyloliquefaciens* (isolado 50), TOM

(isolado 2 e 24), *Staphylococcus aureus* (isolado 18) (Tabela 5). Portanto, mais de 50% deles foram espécies de *Bacillus*.

TABELA 5 Severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) em tomateiros provenientes de sementes bacterizadas pelos 27 melhores isolados bacterianos selecionados anteriormente.

ISOLADOS	SEVERIDADE (%)		% DE CONTROLE	
	2ª Aval	3ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
Acinetobacter johsonii (10)	30,00 a	32,50 a	44,20 a	38,25 a
B. pumilus (12)	33,75 a	32,50 a	37,22 a	38,25 a
Paenibacillus macerans (37)	29,55 a	32,50 a	45,00 a	38,25 a
B. pumilus (39)	37,50 a	33,75 a	30,25 a	35,87 a
B. pumilus (20)	38,75 a	26,25 a	27,92 a	50,12 a
Acinetobacter johsonii (1)	33,75 a	36,25 b	37,22 a	31,12 b
Paenibacillus macerans (15)	33,75 a	38,75 b	37,22 a	26,37 b
B. amyloliquefaciens (36)	32,50 a	38,75 b	39,55 a	26,37 b
B. pumillus (3)	28,75 a	32,50 a	46,52 a	38,25 a
B. pumilus (6)	33,75 a	36,25 b	37,22 a	31,12 b
B. pumilus subg. B (27)	47,50 b	40,00 b	11,65 b	24,00 b
B. megaterium (7)	32,50 a	37,50 b	39,55 a	28,75 b
Pim 11	36,25 a	33,75 a	32,57 a	35,87 a
P. macerans (47)	28,75 a	26,25 a	46,52 a	50,12 a
B. sphaericus (45)	35,00 a	31,25 a	34,90 a	40,62 a
B. sphaericus (42)	33,75 a	37,50 b	37,22 a	28,75 b
B. amyloliquefaciens (50)	42,75 b	30,00 a	20,48 b	43,00 a
P. macerans subg. B (29)	41,25 b	41,25 b	23,27 b	21,62 b
M. liquefaciens (34)	38,75 a	37,50 b	27,92 a	28,75 b
Tom 2	32,50 a	32,50 a	39,55 a	38,25 a
S. aureus (18)	35,00 a	32,50 a	34,90 a	38,25 a
B. sphaericus (43)	33,75 a	36,25 b	37,22 a	31,12 b
Tom 23	35,75 a	44,00 b	33,50 a	16,40 b
Tom 25	37,00 a	42,50 b	31,18 a	19,25 b
Tom 24	45,00 b	30,00 a	16,30 b	43,00 a
B. amyloliquefaciens (28)	41,25 b	41,25 b	23,27 b	21,62 b
B. pumilus (51)	31,50 a	32,50 a	41,41 a	38,25 a
Testemunha	53,75 b	52,50 b	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

A porcentagem de severidade mais baixa da pinta bacteriana foi de 26,25% quando se aplicou *P. macerans* (isolado 47), correspondendo a 50,12% de controle em relação à testemunha, destacando-se como o melhor isolado no controle dessa fitobacteriose. Este isolado inibiu também o crescimento da Pst *in vitro*. Contudo, a severidade da doença variou de 26,25% a 38,75% nesse grupo mais promissor (Tabela 5).

Silva et al. (2004a) investigaram se as rizobactérias selecionadas para controle biológico da *Pseudomonas syringae* pv *tomato* em tomateiro apresentavam também a característica de promoção de crescimento. Assim, foi observado que, para os antagonistas testados não houve correspondência entre a capacidade de promover o crescimento de tomateiro e proteger as plantas contra o patógeno desafiante. Portanto, tais resultados reforçam a divisão, recentemente proposta, dessas bactérias em dois grupo: 1) as que têm potencial para o controle biológico e 2) as promotoras de crescimento. Nesse contexto, Silva et al. (2004a) testaram 28 isolados de rizobactérias para o controle da Pst e, destes, 10 reduziram a severidade em mais de 70%, havendo ainda destaque para dois isolados que reduziram a severidade em praticamente 80%, mas nenhum destes se caracterizou como promotor de crescimento.

Silva & Romeiro (2004) selecionaram 28 rizobactérias capazes de reduzir a severidade da pinta bacteriana em até 60% em relação ao controle. Fazendo dois novos ensaios, foi possível selecionar apenas um isolado, UFV-101 – *Bacillus cereus*, que se manteve efetivo. Para explorar melhor o espectro de ação desta espécie, Silva et al. (2004b) provaram a sua eficiência também no controle de *Alternaria solani, Xv, Oidium, Stemphylium solani* e *Corynespora cassiicola*, caracterizando este isolado como um possível indutor de resistência.

5.2 Inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pst) e relação com o controle da pinta bacteriana do tomateiro

Dos 52 isolados testados apenas 23 inibiram o crescimento da Pst *in vitro*. Desses, *Bacillus pumillus* (isolados 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolados 37 e 47) e *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 50) reduziram ($P< 0,05$) a severidade da pinta bacteriana na última seleção (Tabela 5). Dessa forma, pode-se supor que esses isolados tenham diretamente causado lise nas células bacterianas da Pst, isto é, agindo também por inibição direta do seu crescimento nos tecidos foliares. Por outro lado, isolados, como *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolado 45), TOM (isolados 2 e 24) e *Staphylococcus aureus* (isolado 18), talvez tenham reduzido a severidade da Pst (Tabela 5) pela indução de resistência na planta de tomate, pois não foram caracterizados como antagonistas a Pst. Entretanto, a quantidade de substâncias inibidoras *in vitro* parece não ter relação com a capacidade do isolado endofítico em reduzir a severidade da doença, pois, isolados com baixa(+), média(++) e alta(+++) capacidade de inibição reduziram a severidade da pinta bacteriana na mesma intensidade (Tabela 9). Portanto, os dois métodos de atuação das bactérias provavelmente ocorreram nos isolados mais eficazes aqui testados.

Romeiro et al. (2000) também correlacionaram a inibição "in vitro" com a severidade da pinta bacteriana, pois, dos três isolados bacterianos do filoplano selecionados em função do diâmetro do halo de inibição, dois proporcionaram controle estatisticamente significativo.

TABELA 9 Agrupamento dos isolados bacterianos endofíticos de haste e folhas de pimentão e tomateiro quanto ao diâmetro do halo de inibição (cm) de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*.

Diâmetro do halo (cm)	Espécies e isolados de bactérias endofíticas
Grupo 1 (0,2-0,9) +	*Bacillus pumillus* (isolados 3, 20, 48 e 52)
	Bacillus subtilis (isolado 19)
Grupo 2 (1,0-1,9) ++	*Bacillus pumillus* (isolados 6, 8, 12, 39 e 51)
	Bacillus megaterium (isolado 7)
	Bacillus pumillus subgrpo B (isolados 26 e 27)
	Acinetobacter johnsonii (isolado 9)
Grupo 3 (2,0-2,9) +++	*Bacillus amyloliquefaciens* (isolados 28 e 41)
	Paenibacillus macerans (isolado 47)
Grupo 4 (> 3,0) ++++	*Bacillus amyloliquefaciens* (isolados 22, 32, 36, 50)
	Paenibacillus macerans (isolado 37)

Guo et al. (1996 e 2001) selecionaram os isolados de rizobactérias promotoras de crescimento como promissores agentes de biocontrole pela combinação do halo de inibição formado e a capacidade de crescimento nas raízes. Os isolados *Serratia* sp., *Pseudomonas* e *Bacillus* sp., que produziram halo de inibição, foram testados por Guo et al. (2004) no controle da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, chegando a atingir de 63,3% a 94,1% de controle e aumento a produtividade de 46,3% a 78,5%. Em função do bom desempenho destes isolados, ensaios com formulações foram realizados no

período de dois anos, observando-se estabilidade e manutenção das características de biocontrole.

6 CONCLUSÕES

Dentre 53 isolados de bactérias endofíticas de tomateiro e pimentão, 9 foram eficientes no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.

A espécie *B. pumilus* teve o maior número de isolados eficazes na redução da pinta bacteriana do tomateiro.

Nove isolados de bactérias endofíticas obtidas de pimentão e tomate promoveram o crescimento de plantas de tomate; dentre eles, quatro isolados (*Acinetobacter johnsonii* – 10; PIM 11; *Bacillus pumilus* – 39; *B. sphaericus* – 45) também reduziram a pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.

A capacidade de inibição do crescimento de Pst *in vitro* foi observada em 44,2% dos isolados endofíticos, tendo 34,8% desses isolados reduzido a severidade da pinta bacteriana do tomateiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings againt infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Enviromental Microbiology,** Washington, v. 58, n. 6, p. 2637-2643, 2002.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O.; BATISTA, U. G. Amplitude e efetividade de um actinomiceto pré-selecionado como agente de biocontrole de enfermidades do tomateiro, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 27, p. 222-223, ago. 2002. Resumo.

COLIN, J. E.; CHAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. **Plant Disease,** St. Paul, v. 70, n. 11, p. 1048-1050, Nov. 1986.

GUO, J. H.; GUO, Y. H.; ZHANG, L. X.; QI, H. Y.; FANG, Z. D. Screening for biological agents against cayenne pepper bacterial wilt. **Chinese Journal Biological Control,** Beijing, v. 17, p. 101-106, 2001

GUO, J. H.; WANG, Y. L.; LI, J. Screen of biocontrol bactéria of plant wilt by inhibiting zones and root-colonizing capacity. **Acta Phytopathology Sinica,** Peking, v. 26, p. 49-54, 1996.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, A. L. R.; GARCIA, F. A. O.; MIZUBUTI, E. S. G. Seleção de bactérias de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole parta três patógenos foliares. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 26, p. 488, ago. 2001. Resumo.

JONES, J. B. Bacterial speck. In: JONES, J. B.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases.** Minneapolis: APS Press, 1993. 73 p.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology,** St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KIMURA, O.; CARMO, M. G. F. do. Doenças causadas por bactérias em pimentão. **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 66-76, 1996.

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. 2001. p. 105-123.

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

MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomateiro. **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 15-18, 1996.

ROMEIRO, R. de S.; MACAGNAN, D. Busca, testagem, caracterização e estudo de potencialidades de uma PGPR selecionada para a cultura do tomateiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2., SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 18-43.

ROMEIRO, R. de S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G. de; CARRIER, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopatologica,** São Paulo, v. 26, n. 2, p. 220-224, abr./jun. 2000.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics,** London, v. 30, p. 507-512, 1974.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology,** London, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1977.

SILVA, H. S. A.; DEUNER, C. C.; ROMEIRO, R. S. Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Summa Phytopathologica,** São Paulo, v. 30, n. 3, p. 281-283, jul./set. 2004a.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S. Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. **Revista Ceres,** Viçosa, v. 51, n. 295, p. 345-354, maio/jun. 2004.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; DEUNER, C. C.; CARRER FILHO, R.; GARCIA, F. A. O. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae pv tomato*). **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 26, p. 281, ago. 2001. Resumo.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacteral induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 288-298, Feb. 2004b.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae pv. tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 20, n. 2, p. 179-183, jun. 1995.

STURTZ, A. V.; MATHESON, B. G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant Soil,** Dordrecht, v. 184, n. 2, p. 265-271, 1996.

VAN BUREN, A. M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C. A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology,** St. Paul, v. 83, p. 1406. 1993.

CAPÍTULO 5

EFEITO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS, ACIBENZOLAR-S-METIL, ANTIBIÓTICO E FUNGICIDAS NA REDUÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA BACTERIANA E NA PRODUÇÃO DE TOMATEIROS NO CAMPO

1 RESUMO

SILVA, Juliana Resende Campos. Efeito de bactérias endofíticas, acibenzolar-S-metil, antibiótico e fungicidas na redução da severidade da mancha bacteriana e na produção de tomateiros no campo. In: Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro. Lavras: UFLA, 2004. 160 p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).*

O acibenzolar-S-metil (ASM) foi pulverizado isoladamente, seguido tanto da aplicação da mistura em água dos fungicidas chlorotalonil, mancozeb e oxicloreto de cobre como das bactérias endofíticas: *Bacillus pumilus, B. amyloliquefaciens* e *Paenibacillus gordonae*. O antibiótico oxitetraciclina foi usado em dosagem única. As bactérias *B. pumilus, B. amyloliquefaciens* e *P. gordonae* foram aplicadas em pulverização da folhagem do tomateiro ou irrigadas no solo da rizosfera. Na testemunha, não foi aplicado nenhum produto químico e nem bactérias. A aplicação, tanto dos produtos químicos como das endofíticas, reduziu ($P< 0,05$) a severidade da mancha bacteriana do tomateiro. *Paenibacillus gordonae* e *B. amyloliquefaciens* foram mais eficazes ($P< 0,05$) em pulverização, porém, *B. pumilus* foi indiferente ao modo de aplicação. O ASM aplicado isoladamente foi o tratamento mais eficaz ($P< 0,05$) na redução da severidade da mancha bacteriana. Entretanto, nas aplicações simultâneas, tanto com a mistura de fungicidas como com as bactérias, sua eficácia foi reduzida. A oxitetraciclina foi tão eficaz quanto as bactérias testadas na redução da severidade da mancha bacteriana. A maior produção ($P< 0,05$), dentre todos os tratamentos, foi quando se utilizou *B. amyloliquefaciens* irrigado no solo e a menor na testemunha. Em todos os tratamentos, a produção foi significativamente maior do que na testemunha, com destaque para as aplicações dos isolados de *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*. O ASM, aplicado concomitantemente com *B. amyloliquefaciens* ou *B. pumilus*, proporcionou produção menor do que as aplicações isoladas dessas bactérias. Embora o ASM aplicado isoladamente tenha sido o tratamento que mais reduziu a severidade da doença, a produção, entretanto, foi menor ($P< 0,05$) do que nas parcelas que receberam *B. amyloliquefaciens* ou foram pulverizadas com *B. pumilus*.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador) e Édson Ampélio Pozza - UFLA

2 ABSTRACT

SILVA, Juliana Resende Campos. Effect of endophytic bacteria, acibenzolar-S-methyl, antibiotic and fungicides on the reduction of severity of bacterial spot and on the yield of tomato in field. In: Control of bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) and bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by endophytic bacteria. Lavras: UFLA, 2004. 160 p. (Disseration – Master Program in Phytopathology)*

The acibenzolar-S-methyl (ASM) was sprayed separately or followed, either by application of water mixture of fungicides: chlorothalonyl, mancozeb and copper or by endophytic bacteria: *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens* or *Paenibacillus gordonae*. The antibiotic oxitetracyclin was used in one dosage only. The bacteria: *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* and *P. gordonae* were applied by spraying on the foliage of tomato or irrigated onto the soil rhizosphere. The control plants did not received either chemicals or endophytic bacterium. The application of chemicals or bacteria reduced ($P< 0,05$) the disease severity of tomato bacterial spot. *P. gordonae* and *B. amyloliquefaciens* were more efficient when inoculated by spraying the foliage. However, *B. pumilus* was indifferent to the mode of inoculum application. The ASM applied separately had the greatest efficacy in reducing disease severity. However, in simultaneous applications followed, either by fungicides mixtures or by bacteria, its efficacy was reduced. The oxitetracyclin and the bacteria had similar efficacy in reducing severity of bacterial spot. Among all treatments, yield was highest ($P< 0,05$) when *B. amyloliquefaciens* was irrigated onto the soil, and worst ($P< 0,05$) in control. In all treatments, yield was greater than control, but always greater ($P< 0,05$) in plots that received separately applications of *B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus* as compared to the remaining treatments. In plots when ASM was applied simultaneously with *B. amyloliquefaciens* or *B. pumilus* the yield was lesser than in isolated application of those bacteria. Although ASM applied isolated gave the best disease severity reduction, the yield, however, was lesser ($P< 0,05$) than in the plots that received by *B. amyloliquefaciens* or sprayed *B. pumilus*.

* Guindance Committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Major Professor), Édson Ampélio Pozza - UFLA

3 INTRODUÇÃO

O tomate destaca-se entre as principais olerícolas cultivadas no Brasil, podendo ser utilizado para consumo "in natura" ou pela indústria, na produção de molhos e extratos. Seu cultivo é realizado em todo o país, de pequenas hortas caseiras até produções comerciais em centenas de hectares (Lopes & Santos, 1994). No entanto, a produtividade da cultura, em especial do tomate rasteiro, tem sido afetada por uma série de fatores. Dentre eles, destacam-se: época de cultivo, híbrido utilizado, adubação, preparo do solo, competição por plantas daninhas e o ataque de pragas e doenças. Existem mais de cem doenças que atacam a cultura, prejudicando diretamente a produção e qualidade do fruto (Lopes et al., 2000 e 2001).

Dentre essas doenças, aquelas causadas por bactérias se destacam devido aos prejuízos causados na planta e, principalmente, pela dificuldade de controle. A mancha bacteriana, cujo agente etiológico é a *Xanthomonas vesicatoria,* pode ocorrer em todo o ciclo da cultura, ocasionando prejuízos incalculáveis (Lopes & Santos, 1994; Lopes, 2000 e 2001; Araújo et al., 2004).

O uso de antibiótico, apesar de dispendioso, é razoável na redução da severidade e prejuízos causados pelas fitobacterioses e tem sido feito no campo por produtores quando as condições climáticas não são favoráveis à doença ou quando a população bacteriana não é resistente ao produto (Maringoni et al., 1986; Kurosawa et al., 1998; Stadnick & Buchenauer 1999; Lopes, 2000; Araújo et al., 2003). A aplicação de fungicidas, como oxicloreto de cobre, mancozeb e chlorotalonil, tem efeito bacteriostático (Kimati et al., 1995; Araújo et al., 2003).

Nas últimas décadas, muitas pesquisas têm demonstrado a eficácia de bactérias não patogênicas na redução da severidade de fitobacterioses em casa de vegetação (Bora et al., 1993; Jindal & Thind, 1994; Peixoto et al., 1995;

Assis et al., 1996; Pabitra et al., 1996; Sindhan et al., 1997; Romeiro et al., 2000; Barreti, 2001; Vieira-Junior et al., 2002; Halfeld-vieira et al., 2002 Guo et al., 2004).

Silva et al. (2004a; 2004b; 2004c), Guo et al. (2004) e Silva & Romeiro (2004) têm salientado a indução de resistência como o mecanismo mais provável da eficácia de bactérias não patogências no controle de fitobacterioses. Além dessa indução biológica, os indutores químicos como acibenzolar-S-metil têm sido amplamente estudados (Cole, 1999; Lows et al., 2001; Matheron, 2002; Silva et al., 2003a, 2003b), embora necessitem de ensaios no campo.

Em ensaios anteriores, as espécies bacterianas *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, PIM 11 (espécie não identificada) e *Paenibacillus gordonae* demonstraram boa eficácia no controle de *Xanthomonas vesicatoria* em casa de vegetação, criando assim expectativas sobre sua ação no controle dessa doença no campo. Essa possibilidade enquadra-se na adoção de táticas que minimizam os danos causados por essas doenças sem, contudo, prejudicar em demasia o meio ambiente.

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, comparar a eficiência de espécies bacterianas já selecionadas em casa de vegetação e de aplicações do acibenzolar-S-metil, em tomateiros atacados por *Xanthomonas vesicatoria* em cultivo no campo, na redução da severidade da mancha bacteriana e no aumento da produção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação e manejo das plantas empregadas no ensaio

O experimento foi conduzido em área cultivada anteriormente com tomate no setor de olericultura da Universidade de Rio Verde (FESURV).

Procedeu-se à calagem 3 meses antes do plantio, aplicando-se 3 toneladas de calcário/ha.

A adubação foi feita em função da análise de solo, sendo utilizados no plantio 2.500 kg/ha da fórmula 8:16:16 (N:P:K). Utilizou-se também adubação, via foliar, de sulfato de magnésio na dosagem de 1,2 kg/há, 15 dias após o transplante das mudas. Posteriormente, foi realizada uma adubação de cobertura, por ocasião do início do florescimento das plantas (35 dias após o plantio), sendo adicionados 90 kg/ha de N, na forma de uréia.

Foram utilizadas mudas da cultivar Heinz 7155, suscetíveis à mancha bacteriana. O plantio foi realizado no dia 25 de maio de 2004. O transplantio das mudas foi feito aos 15 dias após a emergência. O espaçamento foi de 0,6 m entre linhas e 0,33 m entre plantas em cada linha, sendo utilizadas duas linhas por canteiro.

Para o controle de plantas daninhas, foram utilizados os herbicidas fluazifop-p-butil (Fusilade 125) 1 L/ha e metribuzin (Sencor 480) 1 L/ha, ambos com volume de calda de 400 L/ha. As aplicações foram efetuadas 10 dias após o transplante das mudas. Cada produto foi aplicado separadamente a fim de se evitar eventuais problemas de incompatibilidade. O intervalo de aplicação foi de cinco dias.

O controle químico de pragas foi realizado utilizando-se: Confidor-700 GRDA (imidacloprid), Tamaron (methamidophos), Orthene 750 BR(acephate) e

Decis 25 CE (deltamethrin). O imidacloprid foi aplicado uma única vez, sete dias após o transplante das mudas. Os demais produtos foram aplicados alternadamente, visando eliminar o risco de resistência de pragas, com o objetivo de amenizar os danos causados pela broca pequena (*Neoleucinodes elegantalis*). A primeira aplicação foi feita 5 dias após o transplante e repetidas a cada 7 dias, e a ordem de rotação dos produtos foi: methamidophos – acephate – deltamethrin. Estas aplicações foram feitas até 15 dias antes da colheita, 80 dias após o transplante.

As plantas foram irrigadas por gotejamento, sendo fornecidos 10 mm de água com turno de rega de 48 horas. Além disso, utilizou-se irrigação por aspersão a cada dois dias, para garantir a alta umidade (água livre) na folha e, conseqüentemente, propiciar condições para a incidência e severidade da mancha bacteriana.

4.2 Obtenção do inóculo e inoculação das bactérias endofíticas *Xanthomonas vesicatoria*

As bactérias endofíticas utilizadas neste experimento foram isoladas de hastes e folhas de tomateiro, identificadas e mantidas em deep freezer (- 80°C) na Universidade Federal de Lavras. As bactérias endofíticas foram transportadas até a Fundação de Ensino Superior de Rio Verde - FESURV em tubos de ensaio contendo o meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970) (MB1). As três espécies de bactérias endofíticas utilizadas neste ensaio foram selecionadas por meio de trabalhos prévios realizados em casa de vegetação e as mais promissoras foram utilizadas para compor o experimento no campo (capítulo 3). A multiplicação do inóculo foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da FESURV, conforme técnicas laboratoriais recomendadas (Mariano, 2000). A concentração das suspensões de cada bactéria endofítica foi ajustada em espectofotômetro para T_{580nm} = 20%.

Dois modos de aplicação dessas bactérias foram estudados: pulverização foliar e irrigação do solo. Na irrigação do solo, aplicaram-se 20 ml da suspensão bacteriana ao redor do colo da planta ao final da tarde. Na pulverização foliar empregaram-se 250 ml da suspensão bacteriana por parcela constituída de 16 plantas. A pulverização foi feita com o atomizador costal, direcionando o jato para os folíolos do tomateiro com o cuidado de pulverizar até o total escorrimento das folhas.

O isolamento da bactéria fitopatogênica (*Xanthomonas vesicatoria*) foi a partir de folhas naturalmente infectadas de tomateiro, em meio 523 de Kado & Heskett (1970), pela técnica das estrias paralelas. Posteriormente, a bactéria foi incubada neste mesmo meio para a preparação das suspensões antes da inoculação. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectofotômetro para A_{540}=0,03, o que corresponde a, aproximadamente, a 10^8 unidades formadoras de colônia/ml (ufc/ml).

A inoculação de *Xanthomonas vesicatoria* foi realizada via pulverização foliar, três dias após a aplicação dos tratamentos. As plantas foram irrigadas por aspersão, 24 horas antes e após a inoculação.

4.3 Montagem do experimento, avaliação dos sintomas e produção

Os tratamentos utilizados no experimento estão descritos na tabela 1.

TABELA 1 Modo, época de aplicação e concentração das bactérias endofíticas, acibenzolar-S-metil, antibiótico e fungicidas, para o controle da mancha bacteriana do tomateiro sob condições de campo.

Tratamento	Modo de aplicação	Concentração/dose g i.a/100L	Época de aplicação
Acibenzolar-S-metil (ASM)	Pulverizado	2,5	15 d.a.t
Tratamento convencional (TC)	Pulverizado	240 + 90 + 110	A cada 7 dias
ASM + TC	Pulverizado	2,5 + 2,40 + 90 + 110	A cada 7 dias
Oxitetraciclina	Pulverizado	100	A cada 7 dias
B. amyloliquefaciens	Irrigado	T_{s80mm} = 20%	15 d.a.t
B. pumilus	Irrigado	T_{s80mm} = 20%	15 d.a.t
Paenibacillus gordonae	Irrigado	T_{s80mm} = 20%	15 d.a.t
B. amyloliquefaciens	Pulverizado	T_{s80mm} = 20%	15 d.a.t
B. pumilus	Pulverizado	T_{s80mm} = 20%	15 d.a.t
Paenibacillus gordonae	Pulverizado	T_{s80mm} = 20%	15 d.a.t
B. amyloliquefaciens + ASM	Pulverizado	T_{s80mm} = 20% + 2,5	15 d.a.t
B. pumilus + ASM	Pulverizado	T_{s80mm} = 20% + 2,5	15 d.a.t
Paenibacillus gordonae + ASM	Pulverizado	T_{s80mm} = 20% + 2,5	15 d.a.t
Testemunha	-	-	-

TC = mancozeb + chlorotalonil e oxicloreto de cobre
d.a.t. = dias após o transplante

Plantas testemunhas não receberam aplicações dos produtos biológicos ou químicos descritos, porém, foram inoculadas com *X. vesicatoria*.

No total, foram estabelecidos 14 tratamentos, organizados em 4 blocos inteiramente casualizados, sendo de 2,31 m^2 a parcela útil. Cada bloco foi constituído por 1 metro de largura e 42m de comprimento, com bordadura de 4,83 m nas duas extremidades.

Foram realizadas quatro avaliações da severidade da doença, com intervalos de sete dias após a primeira aplicação dos tratamentos. Seguiu-se a escala de notas de Sidhu & Webster (1977), sendo avaliadas quatro plantas por parcela.

Em cada parcela, as duas primeiras plantas e as duas últimas de cada extremidade não foram avaliadas. Após cada avaliação, foi calculado o índice de doenças (ID), em que:

$$ID = \Sigma \text{ das notas de cada parcela/n° de notas}$$

As médias foram analisadas pelo Teste Scott-knott (1974) e comparadas com auxílio do programa SISVAR 4.2.

A produção foi avaliada ao término do experimento, quando os frutos foram colhidos e pesados separadamente para cada parcela.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Severidade da mancha bacteriana

Nas quatro avaliações realizadas, com exceção do tratamento em que *Paenibacillus gordonae* foi irrigado no solo, todos os demais proporcionaram reduções significativas no índice de doenças (ID) e, conseqüentemente, na severidade, comparados à testemunha. Na primeira avaliação, os sintomas se resumiram ao terço inferior das plantas, enquanto na segunda os sintomas já foram encontrados no terço médio, com alta severidade no terço inferior (Tabela 2, 3). Nas duas primeiras avaliações observou-se a ocorrência dos sintomas pelos bordos das folhas, indicando, provavelmente, a penetração de *X. vesicatoria* pelos hidatódios, conforme citado por Barretti (2001).

Segundo Assis et al. (1998) algumas bactérias endofíticas são eficientes no controle de doenças bacterianas, inclusive em patossistemas envolvendo o gênero *Xanthomonas*.

resultados no controle *de Ralstonia solanacearum* com aplicações por irrigação do solo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

O ASM aplicado isoladamente em pulverização foi o mais ($P< 0,05$) eficaz na redução da severidade da mancha bacteriana em 3 das 4 avaliações realizadas dentre todos os tratamentos. As misturas do ASM com bactérias endofíticas reduziram a eficácia do ASM (Tabelas 2, 3 e 4). Dessa forma, tanto as bactérias endofíticas como os fungicidas adicionados ao ASM não propiciaram efeito aditivo.

Silva et al. (2003b) comprovaram a possibilidade de aplicação do ASM por irrigação no solo para o controle da mancha bacteriana do tomateiro, o que pode acarretar em redução no custo de produção, uma vez que tal produto poderá ser aplicado via água de irrigação. Resultados semelhantes foram obtidos por Afoka (2000), trabalhando no controle do mosaico do pepino em tomateiro. Imbar et al. (1998) e Silva et al. (2003a, 2203b) obtiveram reduções significativas na severidade da mancha bacteriana do tomateiro em plantas tratadas com ASM, em ensaios em casa de vegetação. Ishida (2004), estudando o patossistema algodoeiro x *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, relatou que não houve efeito aditivo quando se utilizou o ASM simultaneamente com a rizobactéria L2-1. Segundo esta autora, a aplicação simultânea do ASM com a rizobactéria reduziu também a atividade das enzimas responsáveis pela indução de resistência em relação ao tratamento no qual o ASM foi aplicado isoladamente.

Van Buren et al. (1993) observaram redução dos sintomas da podridão anelar da batateira, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, utilizando isolados de bactérias endofíticas. Além disso, *Pseudomonas flourescens* 89B-27 e *Serratia marcescens* 90-166 foram observadas como indutoras de resistência em pepino a *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, bem como a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerium* e *Colletrotrichum*

orbiculare (Liu et al., 1995a, 1995b, 1995c). Colin & Chafik (1986) relataram que aplicações semanais de suspensão de células de dois isolados de *P. fluorescens* controlaram *Pst* com igual eficiência ao tratamento com compostos cúpricos. Ocorreu ainda um leve efeito residual em função da capacidade das bactérias de manter população epifítica residual nas folhas de tomate. Nascimento (1998) observou, em casa de vegetação, redução significativa na incidência de *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro, com a utilização de bactérias endofíticas.

O antibiótico oxitetraciclina foi, na maioria das avaliações, menos eficaz ($P< 0,05$) do que os tratamentos com ASM na redução da severidade da mancha bacteriana, porém, tão eficaz ($P< 0,05$) quanto as endofíticas, exceto para *Paenibacillus gordonae* aplicada via irrigação do solo. Oxitetraciclina reduziu a severidade da mancha bacteriana em torno de 28,85 % nas três últimas avaliações (Tabelas 4).

TABELA 4 Redução da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomateiro cultivar Heinz 7155, em relação à testemunha, aos 7, 14, 21 e 28 dias após o início das aplicações de bactérias endofíticas, acibenzolar-S-metil (ASM), e chlorotalonil + oxicloreto de cobre + mancozeb (TC).

Tratamentos	% de redução em relação à testemunha			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
ASM	74,37 A	64,28 A	37,26 B	44,06 A
TC	79,48 A	38,09 B	31,37 B	27,11 B
ASM + TC	82,04 A	71,43 A	60,78 A	47,45 A
Oxitetraciclina	64,11 B	26,19 B	33,33 B	27,11 B
Bacillus amyloliquefaciens (I)	58,98 B	26,19 B	29,41 B	20,33 B
Bacillus pumilus (I)	43,58 C	26,19 B	33,33 B	23,73 B
Paenibacillus gordonae (I)	43,58 C	14,29 C	5,88 C	12,88 C
Bacillus amyloliquefaciens (P)	76,93 A	28,10 B	33,73 B	38,98 A
Bacillus pumilus (P)	48,72 C	33,34 B	27,46 B	20,33 B
Paenibacillus gordonae (P)	41,02 C	35,71 B	25,50 B	15,24 B
Bacillus amyloliquefaciens + ASM (P)	61,53 B	30,96 B	23,53 B	20,33 B
Bacillus pumilus + ASM (P)	61,53 B	54,76 A	27,46 B	22,03 B
Paenibacillus gordonae + ASM (P)	58,98 B	38,09 B	25,50 B	20,33 B
Testemunha	---------	-------	-------	--------

P – pulverizado; I – irrigado no solo.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

5.2 PRODUÇÃO

Todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha, proporcionando maiores produtividades (Tabela 5), refletindo assim a redução da severidade da mancha bacteriana nas parcelas tratadas em comparação à testemunha (Tabelas 2 e 3). O tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* irrigado no solo, obteve a maior produtividade, que foi de 84,17 t/ha, enquanto a testemunha teve o pior desempenho produzindo 61,45 t/ha. Porém, em todos os tratamentos nos quais o *B. amyloliquefaciens* foi aplicado, ocorreram altas produções, bem como na pulverização de *Bacillus pumillus*, formando assim

quatro tratamentos com as maiores (P< 0,05) produtividades (Tabela 5). Por outro lado, a redução da severidade da mancha bacteriana nesses quatro tratamentos foi menor do que nos tratamentos em que se pulverizou ASM (Tabelas 2 e 3).

Dessa forma, além da eficácia na redução da doença no campo essas espécies bacterianas, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumillus*, com destaque para *B. amyloliquefaciens*, devem promover o crescimento das plantas e melhorar a exploração dos fatores envolvidos na produtividade como a eficácia fotossintética e absorção dos nutrientes do solo.

TABELA 5 Produtividade média de tomateiros em t/há, com aplicações de bactérias endofíticas, acibenzolar-S-metil, chlorotalonil + oxicloreto de cobre + mancozeb, para controle da mancha bacteriana do tomateiro.

TRATAMENTOS	Produtividade (t/ha)	Ganho (%) em relação à testemunha
ASM	70,45 C	14,65
TC	73,65 C	19,86
ASM + TC	73,40 C	19,45
Oxitetraciclina	70,45 C	14,65
Bacillus amyloliquefaciens (I)	84,17 A	36,98
Bacillus pumilus (I)	73,65 C	19,86
Paenibacillus gordonae (I)	72,56 C	18,08
Bacillus amyloliquefaciens (P)	79,54 B	29,45
Bacillus pumilus (P)	79,38 B	29,18
Paenibacillus gordonae (P)	72,81 C	18,49
Bacillus amyloliquefaciens + ASM (P)	77,86 B	26,71
Bacillus pumilus + ASM (P)	73,65 C	19,86
Paenibacillus gordonae + ASM (P)	71,55 C	16,44
Testemunha	61,45 D	0,0
CV (%)	4,25	—

P – pulverizado; I – irrigado no solo.
Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5%.

A bactéria *P. gordonae*, independente do método de inoculação, proporcionou maior produção (P< 0,05) no tomateiro do que a testemunha. Entretanto, *B. amyloliquefaciens*, quando irrigado no solo, proporcionou maior produção (P< 0,05) do que em pulverização e *B. pumillus*, ao contrário, proporcionou maior produção quando pulverizado do que irrigado no solo (Tabela 5).

Trabalhos conduzidos por Hurek et al. (1994) evidenciaram que as bactérias endofíticas são capazes de promover o aumento de produtividade em plantas, em função de uma série de benefícios que vão desde a promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas até a indução de resistência a fitopatógenos.

Ao se avaliar plantas tratadas com o antibiótico oxitetraciclina, observou-se que o mesmo foi eficaz em relação à testemunha, mas não se destacou entre os melhores tratamentos (Tabela 5). Tal fato deve-se provavelmente, à incidência de outras doenças, para as quais o antibiótico não apresentou efeito desejado.

Embora todos os tratamentos com aplicações de ASM, tanto isoladamente como associado a chlorotalonil + oxicloreto de cobre + mancozeb, ou aplicações concomitantes com as endofíticas diferissem da testemunha, a aplicação associada do ASM a *B. amyloliquefaciens* ou a *B. pumillus* reduziu (P< 0,05) a produção, comparada com as aplicações isoladas dessas bactérias (Tabela 5). Dessa forma, parece evidente que a atuação do ASM na planta concorre com a produção, tornando menos eficaz o uso da bactéria endofítica no aumento da produtividade. Como o ASM aplicado isoladamente promoveu grande redução na severidade da mancha bacteriana (Tabelas 2 e 3), esperava-se que este efeito refletisse no aumento de produção além dos demais tratamentos, não só da testemunha, o que não aconteceu (Tabela 5). Portanto, sugere-se que o

ASM na sua atuação como indutor de resistência, gaste energia da planta, não proporcionando aumentos mais expressivos da produtividade.

Em diferentes experimentos de campo com plantas de tomate (Lows et al., 2001), pimentão (Romero et al., 2001) e fumo (Cole, 1999), vários autores relataram o possível gasto de energia na interação ASM e planta, em que a aplicação de ASM semanalmente, em tomateiro e pimentão e cinco aplicações nos campos de fumo, proporcionaram significativo controle da mancha bacteriana e mancha aureolada mas não incrementaram a produtividade das culturas.

Na ausência de patógenos, a aplicação quinzenal de ASM provocou redução na produção e atraso na maturidade dos frutos de pimentão, sugerindo a presença de um custo energético para a planta quando a resistência induzida é expressa constitutivamente (Romero et al., 2001). Em campos de trigo, onde doenças foliares estavam presentes, Stadnik & Buchenauer (1999) observaram que o efeito protetor ocasionado por fungicidas tradicionais resultou em maior produtividade, comparado à proporcionada pela proteção com o ASM, o que interpretaram como um consumo de energia nas plantas induzidas.

Assim, observa-se efeito negativo do indutor em situações nas quais ele é utilizado repetidas vezes e ou em doses mais elevadas, principalmente na ausência de patógenos. Lows et al. (2001) mostraram que ASM alternado com fungicidas cúpricos foliares, de forma que o ativador fosse aplicado quinzenalmente, possibilitou controle da bactéria e aumento na produção de frutos de tomate, fato não obtido em 13 experimentos de campo nos EUA e no Canadá, onde o ativador de plantas havia sido aplicado semanalmente em tomateiro.

Matheron (2002) considera o ASM um produto interessante, principalmente em áreas com histórico de populações de fitopatógenos resistentes a defensivos, como é o caso de tomateiros atacados por *X. vesicatoria*

ou *P. syringae pv. tomato* resistentes a cúpricos, e de locais infestados por espécies de *Phytophthora* que sobrevivem no solo. Assim, estará auxiliando nos programas de alternância de ingredientes ativos para reduzir a pressão de seleção de linhagens patogênicas resistentes.

Silva et al. (2004) conduziram experimento no campo, no qual a rizobactéria foi aplicada via tratamento de sementes, isoladamente e em conbinação com diferentes números de aplicações de clorotalonil na parte aérea. Observou-se que todos os tratamentos proporcionaram redução da severidade da pinta preta (*Alternaria solani*), mela (*Phytophthora infestans*) e septoriose (*Septoria lycopersici*), em relação ao tratamento controle. A rizobactéria, em combinação com o tratamento químico, foi eficiente em condições de campo, tanto protegendo as plantas quanto promovendo o aumento da produção. Os tratamentos que proporcionaram o melhor controle foram aqueles que envolveram o uso de 20 pulverizações com o fungicida clorotalonil. Contudo, o tratamento envolvendo o uso da rizobactéria mais 10 pulverizações com o fungicida foi tão eficiente quanto 20 pulverizações com o fungicida, sem a rizobactéria.

6 CONCLUSÕES

As aplicações de *P. gordonae*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens* reduziram a severidade da mancha bacteriana e aumentaram a produção do tomateiro no campo.

A aplicação de *B. amyloliquefaciens* proporcionou a maior produção dentre todos os tratamentos.

A aplicação do ASM reduziu a severidade da mancha bacteriana sem proporcionar, no entanto, produção semelhante ao tratamento com *B. amyloliquefaciens*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFOKA, G. H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersisci esculentum* Mill. Cv. Volledung) to cucumber mosaic virus. **Crop Portection,** Oxford, v. 19, n. 6, p. 401-405, July 2000.

ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** Passo Fundo, p. 145-200, 2004.

ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, F. C.; RIBEIRO, R. L. D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. Parte 1. **Revisão Anual de Patologia de plantas,** Passo Fundo, p. 107-131. 2003.

ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; COELHO, R. S. B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with Bacillus spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Ed.). **Advances in biological control of plant diseases.** Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 347-353.

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.

BARRETTI, P. B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencial para o biocontrole de enfermidades do tomateiro.** 2001. 38 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BASAN, Y.; BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings againt infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Enviromental Microbiology,** Washington, v. 68, n. 6, p. 2637-2643, 2002.

BORA, L. C.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. N. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology,** Udaipur, v. 23, p. 162-168, 1993.

COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl an inducer of systemic acquired resistance against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection,** Oxford, v. 18, p. 267-273, 1999.

COLIN, J. E.; CHAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. **Plant Disease,** St. Paul, v. 70, n. 11, p. 1048-1050, Nov. 1986.

GUO, J. H.; QI. , H. Y.; GUO, Y. H.; GE, H. L.; GONG, L. Y.; ZHANG, L. X.; SUN, P. H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control,** San Diego, v. 29, n. 1, p. 66-72, Feb. 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MENDONÇA, H. L.; MIZUBUTI, E. S. G. Eficiência de bactérias do filoplano no controle biológico de doenças foliares do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 2, p. 183-184, ago. 2002. Resumo.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, Oct. 1997.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLEN-BERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology,** Oxford, v. 176, n. 7, p. 1913-1923, 1994.

IMBAR, M.; DOOSTAR, H.; SONODA, R. M.; LEIBEE, G. L.; MAYER, T. Elicitors of plant defensive system reduce insect densities and disease incidence. **Journal of Chemical Ecology,** New York, v. 24. n. 1, p. 135-149, Jan. 1998.

ISHIDA, A. K. N. **Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro.** 2004. 130 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JINDAL, K. K.; THIND, B. S. Evalution of green gram microflora for the control for *Xanthomonas campestris* pv. *vigaeradiatae*, the incitant of bacterial leaf spot. **Plant Disease Research,** St. Paul, v. 9, n. 4, p. 319-323, 1978.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, KIMITI & AMORIN (Ed.). **Manual de fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 761-785.

KUROSAWA, C.; SAKAMOTO, H. S.; KOYAMA, G. S. Controle químico de bacterioses do alho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, p. 82-83, 1998. Resumo.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promotiong rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 7, p. 843-847, July 1995a.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promotiong rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 6, p. 695-698, June 1995b.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promotiong rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection an root colonization. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p. 1064-1068, Oct. 1995c.

LOPES, C. A. Bacterioses de hortaliças: situação atual e perspectivas de controle. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado de doenças, pragas e plantas daninhas.** Viçosa: UFV, 2000. p. 187-208.

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, 2001. p. 105-123.

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

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M.; ÁVILA, A. C.; BEZERRA, I. C.; CHARCHAR, J. M.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças: Identificação e Controle. In: SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial.** 2000. p. 88-111.

LOUWIS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease,** St. Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, May 2001.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Métodos de Coloração de bactérias. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia.** Recife: [S. n.], 2000. p. 115-119.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J. M. Controle químico da mancha bacteriana. **Summa Phytopathologica,** Piracicaba, v. 12, n. 1/2, p. 92-101, jan./jun. 1986.

MATHERON, M. E. Supression of *Phytophthora* root and crown rot on pepper plants treated with acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease,** St. Paul, v. 86, n. 3, p. 292-297, Mar. 2002.

NASCIMENTO, A. S. **Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* do tomateiro.** 1998. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.

PABITRA, K.; BORA, L. C.; BHAGABATI, K. N.; KALITA, P. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology,** New Delhi, v. 49, p. 234-237, 1996.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; OLIVEIRA, S. M. A. Ação antagônica de *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 21, n. 3/4, p. 219-224, jul./dez. 1995.

ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M.; CARVALHO, M. G.; CARRER FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agente de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica,** São Paulo, v. 26, n. 2, p. 241-244, abr./jun. 2000.

ROMERO, A. M.; KOUSIK, C. S.; RITCHIE, D. F. Resistance to bacterial spot in Bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease,** St. Paul, v. 85, n. 2, p. 189-194, Feb. 2001.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1977.

SILVA, H. S. A.; DEUNER, C. C.; ROMEIRO, R. S. Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 281-283, jul./set. 2004a.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J. L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MOUTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 6, p. 371-375, June 2004c.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacteral induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 288-298, Feb. 2004b.

SILVA, H. S.; ROMEIRO, R. S. Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 295, p. 345-354, maio/jun. 2004.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 244-248, jul./set. 2003a.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R.; CASTRO, A. M. S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 177-181, abr./jun. 2003b.

SINDHAN, G. A.; PARASHAR, R. D.; INDRA, H.; HOODA, I. Biological control of bacterial leaf of rice caused of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 12, n. 1, p. 29-32, Jan. 1997.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenshut**, Berlin, v. 106, p. 466-475, 1999.

VAN BUREN, A. M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C. A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology,** St. Paul, v. 83, p. 1406, 1993.

VIEIRA-JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; VIEIRA, R. F.; SOARES, D. J.; GARCIA, F. A. O.; MENDONÇA, H. L. Seleção de bactérias residentes de filoplano de feijoeiro como agentes de biocontrole de duas enfermidades de parte aérea. **Fitopatologia Brásileira,** Brasília, v. 27, p. 181, ago. 2002. Suplemento.