



**MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO E
POSSIBILIDADES DE SEU CONTROLE POR
ASSOCIAÇÃO: ENDOFITIA, RESISTÊNCIA
INDUZIDA E VARIETAL**

PATRÍCIA BASTON BARRETTI

2005

PATRÍCIA BASTON BARRETTI

**MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO E POSSIBILIDADES
DE SEU CONTROLE POR ASSOCIAÇÃO: ENDOFITIA,
RESISTÊNCIA INDUZIDA E VARIETAL**

Tese 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 "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Magel

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Barretti, Patrícia Baston

Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por
associação: endofítia, resistência induzida e varietal / Patrícia Baston Barretti. --
Lavras : UFLA, 2005.

141 p. : il.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Bactérias endofíticas. 3. Genótipos resistentes. 4.
Associação simbiótica (ASM). 5. Indução de resistência. 6. Promoção de
resistência natural. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.642932

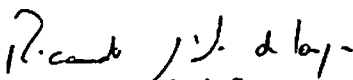
PATRÍCIA BASTON BARRETTI

**MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO E POSSIBILIDADES DE
SEU CONTROLE POR ASSOCIAÇÃO: ENDOFITIA, RESISTÊNCIA
INDUZIDA E VARIETAL**

Tese 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 "Doutor".

APROVADA em 20 de dezembro de 2005.

Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romeiro	UFV
Profa. Dra. Janice Gurdes de Carvalho	UFLA
Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA


Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Maria Gizelda
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e orientado para que eu obtivesse mais esta conquista.

Aos meus pais, Gizelda e Carlos, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Fernanda, pelo auxílio.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Ricardo Magela de Souza, pela amizade, orientação e paciência dispensada durante a realização deste trabalho.

Aos professores Edson Ampélio Pozza e Reginaldo Romeiro, pela co-orientação e apoio.

Aos professores Mário Lúcio Vilela de Resende e Janice Guedes de Carvalho, pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Ao professor Mário Sobral de Abreu, pela amizade e incentivo nos primeiros trabalhos científicos.

Ao professor José da Cruz Machado e ao Cristiano Souza Lima, pelas revisões e sugestões.

Aos professores Ludwig, Vicente e Antônia, pelo intercâmbio de materiais e equipamentos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Ao professor Fabyano Fonseca, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À professora Fátima Moreira, do DCS/UFLA e ao professor Francisco Ribeiro do Vale, da UFV, pela atenção e pelas sugestões apresentadas.

Ao Dr. Carlos Alberto Lopes, da Embrapa Hortaliças e ao prof. Dr. Márcio Antônio da Silveira, da UNITINS, pelo envio das sementes.

À Dra. Adélia Pozza, pela valiosa ajuda na redação do trabalho.

Ao Laboratório de Bacteriologia, Ana Maria, Ana Beatriz, Alessandra, Juliana Barbosa, Juliana Campos, Juliana Pires e Nilvanira, pela amizade, convivência e auxílio.

Aos amigos que conquistei nesta etapa, Rute, Carol, Sylvinha, Zuleide, Cacilda, Florisvalda, Ellen, Letícia, Marcos Freitas, José Mauro, João de Cássia e Jadir, pelos bons momentos compartilhados.

Ao Vitor, pela ajuda durante a condução dos experimentos.

Ao NEFIT, pelas oportunidades.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial à Eliane, Alessandra, Eloísa, Edinho, Sidnei, Carzinho e Tarlei, pela boa vontade sempre demonstradas.

Aos funcionários dos Departamentos de Ciência do Solo e Entomologia, Marlene, Adalberto e Julinho, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas de curso e a todas as demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

!	RESUMO.....	1
!!!	ABSTRACT.....	1
2	CAPÍTULO I: Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por associação: endofita, resistência induzida e varietal.....	1
4	1 Introdução geral.....	2
4	2 Revisão de literatura.....	4
8	2.1 A murcha bacteriana.....	4
9	2.2 Métodos de controle da murcha bacteriana do tomateiro.....	8
13	2.3 Bactérias endofíticas.....	9
15	2.4 Promoção de crescimento de plantas por bactérias endofíticas.....	13
18	2.5 Bactérias endofíticas no controle biológico de patógenos.....	15
19	2.6 Indução de resistência.....	18
20	2.6.1 Resistência sistêmica adquirida (SAR).....	19
22	2.6.2 Resistência sistêmica induzida (ISR).....	20
23	2.6.2.1 Resistência sistêmica induzida por bactérias endofíticas.....	22
	3 Referências bibliográficas.....	23
34	CAPÍTULO 2: Isolamento e seleção de bactérias endofíticas como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro e como agentes de biocontrole da murcha bacteriana.....	34
35	1 Resumo.....	35
36	2 Abstract.....	36
37	3 Introdução.....	37
39	4 Material e métodos.....	39
39	4.1 Instalação dos experimentos.....	39
39	4.2 Obtenção do isolado de <i>Ralstonia solanacearum</i> e classificação em biovar.....	39
40	4.3 Coleta de plantas de tomateiro sadias.....	40
41	4.4 Isolamento de bactérias endofíticas de folhas e caules de tomateiro.....	41
42	4.5 Isolamento de bactérias endofíticas de raízes de tomateiro.....	42
43	4.6 Cultivo e preservação das culturas bacterianas obtidas.....	43
43	4.7 Introdução das bactérias endofíticas em plantas de tomateiro.....	43
44	4.8 Seleção de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas e controlar a murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	44
45	4.9 Nova seleção entre os isolados de bactérias endofíticas com potencial para controlar a murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	45

4.10 Nova seleção entre os isolados de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas de tomateiro em casa de vegetação.....	46
4.11 Detecção de atividade <i>in vitro</i> dos isolados de bactérias endofíticas sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	47
4.12 Caracterização parcial dos isolados de bactérias endofíticas selecionados.....	47
4.12.1 Reação de Gram.....	48
4.12.2 Relação com o oxigênio livre.....	48
4.12.3 Pigmento fluorescente.....	49
4.12.4 Reação de hipersensibilidade (HR).....	49
5 Resultados e discussão.....	50
5.1 Classificação do isolado de <i>R. solanacearum</i> em biovar.....	50
5.2 Isolamento de bactérias endofíticas de plantas de tomateiros sadias.....	51
5.3 Seleção de bactérias endofíticas com potencial para controlar a murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	51
5.4 Seleção de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas de tomateiro em casa de vegetação.....	56
5.5 Detecção de atividade <i>in vitro</i> dos isolados de bactérias endofíticas sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	60
5.6 Caracterização morfológica e fisiológica dos isolados de bactérias endofíticas.....	60
6 Conclusões.....	63
7 Referências bibliográficas.....	64
CAPÍTULO 3: Associação de bactérias endofíticas e genótipos resistentes visando ao controle da murcha bacteriana do tomateiro.....	70
1 Resumo.....	71
2 Abstract.....	72
3 Introdução.....	73
4 Material e métodos.....	75
4.1 Instalação dos experimentos.....	75
4.2 Origem e preservação do patógeno.....	75
4.3 Origem, isolamento e preservação dos isolados de bactérias endofíticas.....	76
4.4 Associação entre bactérias endofíticas e genótipos de tomateiros com diferentes níveis de resistência a <i>R. solanacearum</i> no controle da murcha bacteriana em casa de vegetação.....	76
4.5 Comparação entre métodos de introdução de bactérias endofíticas para o controle da murcha bacteriana do tomateiro.....	78
4.5.1 Introdução de bactérias endofíticas por microbiolização de sementes.....	78

79	4.5.2 Introdução de bactérias endofíticas por irrigação do substrato.....
79	4.5.3 Introdução de bactérias endofíticas pelo corte do hipocótilo.....
80	5 Resultados e discussão.....
80	5.1 Associação entre bactérias endofíticas e genótipos de tomates com diferentes níveis de resistência a <i>R. solanacearum</i> no controle da murcha bacteriana em casa de vegetação.....
82	5.2 Comparação entre métodos de introdução de bactérias endofíticas para o controle da murcha bacteriana do tomateiro.....
85	6 Conclusões.....
86	7 Referências bibliográficas.....
89	CAPÍTULO 4: Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) na proteção contra a murcha bacteriana do tomateiro.....
90	1 Resumo.....
91	2 Abstract.....
92	3 Introdução.....
94	4 Material e métodos.....
94	4.1 Instalação dos experimentos.....
94	4.2 Produção de mudas.....
94	4.3 Origem e preservação do patógeno.....
95	4.4 Efeito do modo de aplicação do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro e no crescimento de plantas.....
95	4.5 Efeito de épocas de aplicação e doses de manutenção do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro.....
97	4.6 Efeito do ASM na densidade populacional de <i>Ralstonia solanacearum</i>
98	5 Resultados e discussão.....
100	5.1 Efeito do modo de aplicação do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro e no crescimento de plantas.....
100	5.2 Efeito de épocas de aplicação e doses de manutenção do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro.....
105	5.3 Efeito do ASM na densidade populacional de <i>Ralstonia solanacearum</i>
107	6 Conclusões.....
109	7 Referências bibliográficas.....
113	CAPÍTULO 5: Promoção de crescimento de plantas de tomateiro induzido por bactérias endofíticas.....
114	1 Resumo.....
115	2 Abstract.....
116	3 Introdução.....
118	4 Material e métodos.....

4.1 Instalação dos experimentos.....	118
4.2 Origem, isolamento e preservação dos isolados de bactérias endofíticas.....	118
4.3 Introdução das bactérias endofíticas em plantas de tomateiro.....	119
4.4 Avaliação do potencial de promoção de crescimento de tomateiro por isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados em ensaios em casa de vegetação.....	120
4.4.1 Matéria fresca das plantas.....	120
4.4.2 Área foliar das plantas.....	121
4.4.3 Matéria seca e análise nutricional das plantas de tomateiro.....	121
4.5 Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em fixar nitrogênio (N ₂).....	122
4.6 Análise estatística.....	123
5 Resultados e discussão.....	124
5.1 Avaliação do potencial de promoção de crescimento de tomateiro por isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados em ensaios em casa de vegetação.....	124
5.2 Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em fixar nitrogênio (N ₂).....	126
5.3 Teor de nutrientes nas plantas de tomateiro.....	127
5.4 Eficiência nutricional de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas.....	129
5.5 Relação do acúmulo de nutriente entre a parte aérea e as raízes.....	134
6 Conclusões.....	137
7 Referências bibliográficas.....	138

RESUMO

BARRETTI, Patrícia Baston. **Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por associação: endofítia, resistência induzida e varietal.** 2005. 141p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - UFLA, Lavras, MG.*

A murcha bacteriana é considerada uma das principais doenças das solanáceas, sendo o tomateiro uma das espécies de importância econômica mais severamente afetadas. Geralmente, as maiores incidências da doença ocorrem em regiões de alta temperatura e umidade do solo, tornando-se fatores limitantes à tomaticultura. A utilização de agentes de controle biológico e de produtos químicos indutores de resistência tem sido consideradas tática promissora no controle de várias bacterioses. O presente trabalho teve como objetivos isolar e selecionar bactérias endofíticas capazes de controlar a murcha bacteriana do tomateiro e promover o crescimento das plantas, avaliar o potencial em conjunto de bactérias endofíticas e genótipos de tomateiro com diferentes níveis de resistência no controle da murcha bacteriana e avaliar o efeito do ASM na indução de resistência a *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. Cento e cinquenta isolados de bactérias endofíticas foram obtidos a partir de raízes, caules e folhas de tomates sadios, provenientes de plantios convencionais e hortas orgânicas, coletados em diferentes municípios de Minas Gerais. Todos os isolados obtidos foram testados, em diversos ensaios em casa de vegetação, quanto à eficiência na redução da severidade da murcha bacteriana e à promoção de crescimento em plantas de tomateiro. Os isolados UFV-E34 e UFLA 25-LS foram os mais eficazes na redução da doença. Submetidos a testes *in vitro*, estes isolados não apresentaram efeito inibitório direto a *R. solanacearum*. Os diferentes genótipos de tomates tratados com os isolados endofíticos selecionados apresentaram redução nos sintomas da doença, quando comparados às respectivas testemunhas não tratadas. O isolado UFV-E34 foi mais eficaz do que o UFLA 25-LS na associação com as cultivares, com exceção da cv. Caraíbe, que não apresentou diferença significativa entre os isolados. Os métodos de introdução de bactérias endofíticas avaliados não diferiram entre si. A aplicação de ASM, tanto via pulverização foliar quanto irrigação do solo, reduziu a severidade da doença em relação à testemunha não tratada. As doses de manutenção do ASM (0,625, 1,25 e 2,5g i.a./100L de água) proporcionaram reduções intermediárias da severidade, diferindo entre si e dos demais tratamentos. Em relação às épocas de aplicação, não houve diferença quando o produto foi aplicado uma ou duas vezes após a inoculação com *R. solanacearum*. Os isolados UFV-E17, UFV-E22, UFV-E25, UFV-E26, UFV-E27, UFV-E29, UFV-E49, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS e UFLA 11-LS foram os

mais eficazes na promoção do crescimento das plantas de tomate. O isolado UFV-E49 apresentou melhor resultado para altura, área foliar, número de folhas e peso da matéria fresca e seca tanto da parte aérea quanto da raiz. Os isolados UFLA 11-LS e UFV-E49 propiciaram a maior eficiência de absorção de P em relação à testemunha. O isolado UFLA 11-LS também foi o mais eficaz na utilização de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe e Zn e UFV-E49 de Mn, embora os maiores teores de N, P, K, Mg e Zn tenham sido encontrados na parte aérea das plantas inoculadas com o isolado UFV-E49.

***Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV e Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-orientadores).**

ABSTRACT

BARRETTI, Patrícia Baston. **Tomato bacterial wilt and possibilities of its control through the association of endophytic bacteria and induced and variety resistance.** 2005. 141p. Thesis (Doctorate in Phytopathology) - UFLA, Lavras, MG.*

Bacterial wilt is one of the major diseases of Solanaceae, causing severity infection in tomato plants, one species of economical importance. Usually, the largest incidence of the disease occurs in areas of high temperature and soil moisture. The use of biological control agents and chemical products to induce resistance has been promising in the control of several bacterial diseases. The present work had as objectives to isolate and select endophytic bacteria to control tomato bacterial wilt and promote plant growth; to evaluate the potential of endophytic bacteria and tomato genotypes with different resistance levels in the control of bacterial wilt and evaluate the effect of ASM in the resistance induction against *Ralstonia solanacearum* in tomato. One hundred and fifty isolates of endophytic bacteria were obtained from roots, stems and leaves of healthy tomato from commercial plantings and organic farms, collected in different places in Minas Gerais State. All isolates were tested in greenhouse for the efficiency to reduce the severity of bacterial wilt and to promote plant growth in tomato. Isolates UFV-E34 and UFLA 25-LS were the most efficient in reducing disease severity. *In vitro* studies those isolates did not inhibit the growth of *R. solanacearum*. The different tomato genotypes treated with the selected isolates of endophytic bacteria produced reduction in disease symptoms, when compared to non treated plants. The isolate UFV-E34 was more efficient than UFLA 25-LS in the association with the cultivars, except for cv. Caribe in which no significant difference among the isolates was observed. The methods used to apply endophytic bacteria did not differ to each other. Applications of ASM, by foliar spraying or by soil drenching, reduced disease severity in relation to untreated plants. The maintenance doses of ASM (0.625, 1.25 and 2.5g a.i./100L of water) provided intermediate reductions of the disease severity. In relation to application time, there was no difference when the product was applied within one or two times after the inoculation with *R. solanacearum*. The isolates UFV-E17, UFV-E22, UFV-E25, UFV-E26, UFV-E27, UFV-E29, UFV-E49, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS and UFLA 11-LS were the most efficient in promoting growth of tomato plants. Isolate UFV-E49 was the most efficient in relation to height, leaf area, number of leaves, and fresh and dry weight of the aerial part of plant as well as to the roots. Isolates UFLA 11-LS and UFV-E49 provided the highest rates of P uptake in relation to untreated plants. Plants applied with isolate UFLA 11-LS were also the most efficient in the utilization

of N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe and Zn. UFV-E49 promoted the highest utilization of Mn, although the largest contents of N, P, K, Mg and Zn were found in the aerial part of plants inoculated with the UFV-E49.

***Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Avdiser), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV and Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-advisers).**

CAPÍTULO 1

MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO E POSSIBILIDADES DE SEU CONTROLE POR ASSOCIAÇÃO: ENDOFITIA, RESISTÊNCIA INDUZIDA E VARIETAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (1995), é considerada a principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde infecta várias espécies de plantas pertencentes a mais de 44 famílias botânicas (Hayward, 1991).

Dentre as espécies vegetais de importância econômica suscetíveis à doença, as solanáceas são as mais severamente afetadas, ocorrendo grandes perdas em culturas, como as de batata, tomate, pimentão, berinjela e fumo. Amendoim, banana e gengibre são exemplos de espécies não pertencentes à família Solanaceae também afetadas severamente pela murcha bacteriana (Lopes & Reifschneider, 1999). No Brasil, a murcha bacteriana é fator de risco para a produção de batata em todas as áreas onde ela é cultivada. Para tomate, pimentão, berinjela e jiló, as maiores perdas foram observadas nas regiões Norte e Nordeste e em áreas de baixa altitude do Centro-Oeste (Lopes & Reifschneider, 1999).

Pelo fato deste patógeno atuar no sistema vascular, ser habitante do solo e estar associado a um grande número de espécies botânicas, o controle desta bacteriose torna-se extremamente difícil (Lopes & Reifschneider, 1999). Como medidas de controle podem ser citados o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas, a seleção de material de plantio livre do patógeno e o uso de microrganismos antagonistas (Michel et al., 1996).

Centenas de espécies de plantas são relatadas como hospedeiras suscetíveis, sendo pouco conhecido a que raças ou biovars do patógeno estas espécies são suscetíveis. A ausência desta informação torna difícil o estabelecimento das relações patógeno-hospedeiro, já que uma planta pode ser hospedeira de um ou mais isolados do patógeno, tornando problemática a

escolha de culturas a serem utilizadas em programas de rotação. Ainda, a falta de conhecimento sobre os isolados existentes em uma determinada área, dificulta e, às vezes, torna inviável a seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento (Hayward, 1994). Assim, a caracterização de populações bacterianas ocorrentes em diferentes regiões geográficas é extremamente importante para o estudo da epidemiologia da doença e o desenvolvimento de estratégias para seu controle.

Diante das dificuldades citadas, torna-se necessário o estudo de novas alternativas no controle desta bacteriose. Dentro de um programa de manejo integrado, o controle biológico e os químicos indutores de resistência vêm recebendo especial atenção recentemente. O primeiro, por se tratar de um método natural, de ocorrência freqüente na natureza, sem causar impactos ao meio ambiente e nem efeitos toxicológicos e o segundo, devido à sua condição de amplo espectro e inespecificidade, podendo auxiliar no controle de várias doenças na mesma cultura. Dentro deste contexto, a utilização de bactérias endofíticas e do acibenzolar-S-metil surge como ferramenta promissora na redução da murcha bacteriana do tomateiro, oferecendo uma opção adicional para o agricultor, complementar à resistência genética à doença.

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho: isolar e selecionar bactérias endofíticas capazes de controlar a murcha bacteriana do tomateiro e promover o crescimento das plantas, avaliar o potencial em conjunto de bactérias endofíticas e genótipos de tomateiro com diferentes níveis de resistência no controle da murcha bacteriana e avaliar o efeito do ASM na indução de resistência a *R. solanacearum* em tomateiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A murcha bacteriana

O primeiro relato da murcha bacteriana foi feito nos Estados Unidos, em 1896, por Erwin F. Smith, afetando batata, tomate e berinjela (Vaughan, 1944). No Brasil, a murcha bacteriana foi relatada por Von Parseval, em 1922, em fumo e batata, no estado do Rio Grande do Sul (Takatsu & Lopes, 1997). Desde o primeiro relato da doença, foram divulgadas numerosas informações sobre a sua ocorrência, refletindo a ampla distribuição do patógeno e sua importância econômica.

O agente causal da murcha bacteriana foi descrito pela primeira vez por Smith, em 1896, como *Bacillus solanacearum* e, desde então, vem recebendo diferentes denominações. A nomenclatura dada em 1914 pelo próprio Smith, de *Pseudomonas solanacearum*, prevaleceu por quase 80 anos, até que, em 1992, a bactéria foi reclassificada, por Yabuuchi et al. (1992), como *Burkholderia solanacearum* (Smith). Entretanto, menos de três anos depois, com base na análise de lipídeos e de ácidos graxos, nas características fenotípicas e na homologia de DNA, foi novamente reclassificada, dentro do mesmo grupo, porém, como um novo gênero, *Ralstonia*, para abrigar o grupo de homologia de DNA distinto do grupo da espécie *Burkholderia cepacia* (Yabuuchi et al., 1995). Neste novo contexto, o gênero *Pseudomonas* passou a ser apenas das espécies fluorescentes (grupo I) e as fitopatogênicas não fluorescentes ficaram distribuídas entre os gêneros *Acidovorax* no grupo III e *Burkholderia* e *Ralstonia* no grupo II. O gênero *Ralstonia* passou a abranger as espécies de *R. pickettii* e de *R. solanacearum* (Yabuuchi et al., 1995).

Ralstonia solanacearum é uma bactéria gram negativa, aeróbia estrita, catalase positiva, em forma de bastonete reto ou levemente curvo (nunca

helicoidal), medindo 0,5 a 0,7 x 1,5 a 2,5 micrômetros. móvel por um a quatro flagelos polares (raramente não móvel), não esporogênica, não fluorescente e não cresce a 40°C (Agrios, 2005).

Kelman & Jensen (1951) relataram que, quanto à morfologia, podem ser observados diferentes tipos de colônias: normais, cujas colônias são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas, mutantes, de colônias redondas, translúcidas, rugosas e não fluidas. Os autores observaram ainda, que em meio de cultura contendo tetrazólio, as colônias normalmente mais virulentas são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas, brancas ou levemente avermelhadas no centro e as mutantes avirulentas, completamente vermelhas. Diferenças entre tipos de colônias e níveis de virulência estão relacionadas à presença e quantidade de um mucopolissacarídeo extracelular da bactéria. Este patógeno apresenta grande variação e a maioria dos isolados perde facilmente a patogenicidade quando mantida em meio de cultura, sendo este fenômeno relacionado a mutações que levam à variação da colônia (Kelman & Sequeira, 1965).

Por se tratar de uma espécie complexa e de grande variabilidade, a classificação de *R. solanacearum* em nível subespecífico tem sido feita de acordo com plantas hospedeiras, distribuição geográfica, patogenicidade e propriedades fisiológicas (Hayward, 1964).

Considerando-se as características fisiológicas, os isolados do patógeno foram classificadas em quatro biovars, de acordo com a utilização de três açúcares (lactose, maltose e celobiose) e de três álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol) como única fonte de carbono e na formação de ácidos (Hayward, 1964). Mais tarde foi identificado o biovar V, o qual assemelha-se ao biovar II (Hayward, 1994). Já as raças relatadas baseiam-se, principalmente, na gama de hospedeiro que a bactéria infecta (Agrios, 2005; Hayward, 1964). A raça I infecta um grande número de plantas, incluindo batata, tomate, fumo e

solanáceas em geral. A raça 2 infecta banana e outras musáceas. A raça 3 é considerada específica da batata, mas está associada também ao tomate e ao pimentão. A raça 4 infecta gengibre e a raça 5 amora (Hayward, 1991; 1994).

Dentre as várias subdivisões encontradas dentro de *R. solanacearum*, a raça 3 apresentou o menor nível de heterogeneidade. Esses resultados são consistentes com a classificação destes isolados em raças e biovars, pois a raça 3, equivalente ao biovar II, apresentou o menor círculo de hospedeiras, sendo basicamente limitada à batata (Hayward, 1991).

Em levantamento feito no Brasil, Reifschneider & Takatsu (1985) verificaram a ocorrência da murcha bacteriana em todas as regiões do país, sendo evidenciada a existência das três raças e três das biovars descritas. O biovar I ocorre em todas as regiões geográficas, o biovar II é mais comum no sudeste, sul e centro-oeste e o biovar III ocorre com mais frequência nas regiões norte e nordeste. Os demais biovars não foram detectados.

O patógeno *R. solanacearum* é habitante do solo e invade o hospedeiro através de injúrias nas raízes ou em pontos de emergência de pêlos radiculares e raízes laterais. As injúrias nas raízes podem ser causadas por nematóides, implementos agrícolas utilizados nas práticas culturais ou no transplântio das mudas (Hayward, 1991; Kelman et al., 1994).

O aparecimento da murcha, inicialmente nas folhas superiores, ocorre dentro de poucas dias nas plantas infectadas em condições favoráveis à doença (Akiew & Trevorrow, 1994). Os sintomas podem surgir em qualquer estágio de desenvolvimento da hospedeira, entretanto, a murcha total é mais freqüente quando a infecção ocorre em plantas jovens (Hayward, 1991). As seções longitudinais do caule de plantas infectadas apresentam fluxo bacteriano caracterizado por exsudação de pus (Agrios, 2005). As plantas infectadas que sobrevivem à murcha bacteriana apresentam nanismo, amarelecimento das folhas murchas e, às vezes, estrias escuras são formadas ao longo do caule e

pecíolos (Goto, 1992). A epinastia dos pecíolos e o desenvolvimento de raízes adventícias são comuns em tomateiros infectados (Agrios, 2005). Entretanto, a expressão dos sintomas varia com o hospedeiro e com as condições ambientais.

As plantas infectadas com isolados pouco virulentos não murcham, mas apresentam sintomas de nanismo e formação de raízes adventícias (Goto, 1992). Plantas suscetíveis murcham repentinamente, quando infectadas com isolados altamente virulentos do patógeno, segundo Grimault et al. (1994) e Kelman et al. (1994). Buscando explicar o mecanismo da murcha, esses autores extraíram substâncias de tomateiros inoculados com isolados altamente virulentos, de fraca virulência e avirulentos. Por meio de ensaios realizados com filtrados destas substâncias, verificou-se que um polissacarídeo extracelular produzido pelo isolado altamente virulento, mas não pelo isolado avirulentp, foi o fator primário na indução da murcha. Este polissacarídeo aumentou a viscosidade do fluido vascular, interferindo no movimento de água nos vasos.

A bactéria sobrevive melhor sob condições de alta umidade do solo, entretanto, a doença também ocorre em solos bem drenados (Hayward, 1991), sendo a severidade aumentada quando as plantas infectadas são expostas à seca (Hayward, 1994).

Alta temperatura também é requisito para favorecer o desenvolvimento da doença sob condições de campo. A temperatura ótima está entre 25°C a 35°C, mas, em alguns casos, pode ocorrer murcha em batata em regiões temperadas (Kelman et al., 1994; Takatsu & Lopes, 1997).

O conhecimento da ecologia e sobrevivência da bactéria em solos naturalmente infestados é de grande importância, pois a presença de certas plantas, hospedeiras ou não, afetam a incidência da murcha no campo (Hayward, 1994). Viana (1995) constatou que várias plantas consideradas não suscetíveis e tradicionalmente cultivadas nos núcleos rurais do Distrito Federal, como beterraba, cenoura, coentro, feijão, caupi, pepino, quiabo, repolho e salsa foram

capazes de manter elevada a população de um isolado da biovar I de *R. solanacearum* altamente virulento à batata e ao tomateiro.

A disseminação do patógeno ocorre, principalmente, por meio de materiais propagativos infectados, tais como tubérculos de batata, rizomas e mudas (Hayward, 1991). O uso de ferramentas contaminadas em práticas culturais e o movimento de solo ou água de irrigação contaminados podem ser importantes fatores na disseminação da bactéria e introdução da doença em novas áreas (Hayward, 1994). Restos culturais infectados e tubérculos assintomáticos deixados no campo podem ser importantes fontes de inóculo para culturas subseqüentes. A rápida multiplicação da bactéria em condições propícias aumenta a quantidade de inóculo liberado pelas raízes de plantas doentes e a infecção de plantas vizinhas. A exsudação da bactéria em plantas de fumo doentes pode ser distribuída às plantas sadias próximas, sob condições de chuva e vento (Hayward, 1991; Melton & Powell, 1991).

2.2 Métodos de controle da murcha bacteriana do tomateiro

O estabelecimento de medidas de controle da murcha é difícil devido à sobrevivência do patógeno no solo, à ampla gama de hospedeiros e à variabilidade da bactéria, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis à doença (Takatsu & Lopes, 1997). As medidas a serem adotadas dependem da cultura, dos isolados do patógeno presentes, do conhecimento do seu sítio de sobrevivência e dos modos de transmissão (Hayward, 1994). Dentre essas estratégias, incluem-se a seleção de material de plantio livre do patógeno, a rotação de culturas, a eliminação de plantas invasoras suscetíveis e o uso de microrganismos antagonistas e de cultivares resistentes (Michel et al., 1996). A utilização de produtos químicos, incluindo antibióticos e fungicidas não apresentou sucesso no controle da doença (Takatsu & Lopes, 1997).

Embora a bactéria sobreviva no solo por vários anos, o cultivo intercalado com culturas como arroz, milho, cana-de-açúcar e grama tem sido usado para a redução da população do patógeno (Bringel, 1997).

Alguns agentes de controle biológico, como *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* sp. promoveram a redução da doença (Anuratha & Gnanamanickam, 1990; Agrios, 2005). Há indicações de que o uso de mutantes avirulentos de *R. solanacearum* também é promissor, entretanto, nenhum dos meios de controle biológico da murcha bacteriana alcançou o ponto de aplicação comercial (Hayward, 1991).

O meio mais efetivo de controle da murcha bacteriana tem sido o melhoramento visando resistência genética à doença. No entanto, o exato padrão genético de resistência para os vários isolados do patógeno ainda não foi definido para qualquer dos principais hospedeiros (Takatsu & Lopes, 1997).

Fontes de resistência à murcha bacteriana têm sido relatadas em várias espécies hospedeiras, tais como berinjela, batata e tomate, apesar de variedades com alto nível de resistência desenvolvidas em determinado local não se desenvolverem bem em outras condições ambientais ou a outros isolados do patógeno (Kelman et al., 1994).

2.3 Bactérias endofíticas

A teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti (1926), citado por Hallmann et al., 1997. Porém, estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas sadias por bactérias datam de 1870, com trabalhos de Pasteur e de outros pesquisadores (Hollis, 1951).

Desde 1940, as pesquisas relatam a presença de bactérias endofíticas em diferentes tecidos de diversas espécies de plantas, tais como raízes de cenoura,

beterraba, nabo e alfafa; tubérculos de batata e batata doce; caules de feijão e sorgo; raízes e caules de arroz, milho, algodão e café; folhas de repolho, rabanete, gerânio e videira; flor de algodão e frutos de tomate e melão (Hallmann et al., 1997; Sturtz et al., 2000).

As bactérias já isoladas de tecidos internos de plantas sadias compreendem mais de 129 espécies, representando aproximadamente 54 gêneros, dos quais *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* são os mais comuns (Hallmann et al., 1997; Sturtz et al., 2000).

Os primeiros relatos consideravam as bactérias endofíticas como contaminantes resultantes da desinfestação superficial incompleta ou como patógenos fracamente virulentos (Hollis, 1951; Thomas & Graham, 1952). Entretanto, pesquisas recentes têm demonstrado que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e reduzir sintomas de doenças causadas por diversos patógenos (van Peer & Schippers, 1989; Frommel et al., 1991; Chen et al., 1995; Pleban et al., 1995).

Existem várias definições para o termo endofítico que, em geral, inclui bactérias e fungos (Chanway, 1996). As bactérias endofíticas foram definidas por Kado (1992) como bactérias residentes dentro de tecidos de plantas vivas sem causar dano ou benefício, garantindo apenas residência. Porém, essa definição é considerada bastante restrita, pois exclui a possibilidade das bactérias endofíticas desenvolverem relações simbióticas com seu hospedeiro. Por outro lado, Quispel (1992) definiu como endofíticas apenas as bactérias que estabelecem simbiose com a planta, por meio da qual a planta recebe um benefício ecológico com a presença do simbionte, como aumento na tolerância ao estresse ou promoção de crescimento. Entretanto, esta definição também é restrita, pois, exclui bactérias que exercem efeito neutro ou desprezível na planta. Hallmann et al. (1997) consideraram como endofíticas as bactérias isoladas de um tecido de planta desinfestado superficialmente ou então extraídas

de dentro da planta e que, aparentemente, não causem dano ao hospedeiro. Esta definição inclui bactérias que colonizam os tecidos internos e apresentam efeito neutro, bem como as simbiotes.

A técnica utilizada no isolamento é importante e limitante nas investigações sobre bactérias endofíticas e baseia-se nas definições propostas para o termo endofítico. Teoricamente, o procedimento de isolamento deve recuperar somente a população total interna da planta. Contudo, a desinfestação superficial incompleta do órgão ou a penetração do produto desinfestante nos tecidos resultam na perda de alguns endofíticos (Hallmann et al., 1997).

Os procedimentos mais comuns empregados no isolamento de bactérias endofíticas compreendem a trituração de tecidos de planta desinfestados superficialmente (Hallmann et al., 1997), a centrifugação (De Wit & Spikman, 1982) e a extração por bomba de pressão (Hallmann et al., 1997) ou de vácuo (Bell et al., 1995). A decisão sobre o método a ser utilizado depende do nicho físico de interesse e de fatores dependentes da planta (espécie, idade e tecido), bem como da viabilidade da fonte e do número total de amostras a serem processadas. Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens. Assim, cabe ao pesquisador selecionar a técnica específica mais adequada aos objetivos da pesquisa em questão.

As bactérias endofíticas, por colonizarem o interior dos tecidos, possuem vantagens no que tange à sobrevivência em relação às bactérias residentes de filoplano, pois ficam menos expostas às condições adversas do meio ambiente, como flutuações de temperatura e umidade e exposição à radiação ultravioleta. Esta vantagem existe também em relação às rizobactérias, pois estas estão continuamente expostas à ação dos antagonistas da microbiota do solo (McInroy & Kloepper, 1995; Hallmann et al., 1997).

Evidências indicam que as bactérias endofíticas originam-se de comunidades bacterianas da rizosfera e do filoplano. Comparações entre

comunidades bacterianas internas e externas de pepino, algodão e batata mostram que quase todas as endofíticas também foram encontradas na rizosfera, confirmando a hipótese de que microrganismos associados externamente às raízes são capazes de colonizar, inicialmente, a endoderme e o córtex radicular e então colonizar outros órgãos da planta (Sturtz, 1995; Kloepper et al., 1992a).

Geralmente, a entrada de bactérias nos tecidos da planta pode ser via estômatos, lenticelas, ferimentos (incluindo tricomas quebrados) e áreas de emergência de raízes laterais e radículas. Entretanto, a principal entrada de bactérias endofíticas são os ferimentos, os quais ocorrem naturalmente durante o crescimento da planta ou então, podem ser induzidos por fatores bióticos como fungos, nematóides e insetos ou fatores abióticos como aração, enxertia e podas de raízes (Hallmann et al., 1997). Estes ferimentos nas raízes atraem as bactérias endofíticas pela liberação de exsudatos radiculares, os quais servem de fonte de nutrientes (Hallmann et al., 1997).

Além de entrarem nas plantas por penetração passiva, as bactérias endofíticas também podem penetrar ativamente nos tecidos das plantas. Esta hipótese foi sustentada pela presença de enzimas celulolíticas e pectinolíticas produzidas por endofíticas como *Azoarcus* sp., *Azospirillum irakense* e *Pseudomonas fluorescens*. No entanto, estas enzimas são produzidas apenas para penetração na planta hospedeira e não após a colonização interna (Hurek et al., 1994; Benhamou et al., 1996; Quadt-Hallmann et al., 1997a). Aliás, a produção constitutiva dessas enzimas é indesejável, pois conferiria às bactérias endofíticas característica de patogenicidade (Collmer et al., 1992), devendo, portanto, ser regulada em termos de quantidade e tempo de expressão.

Uma vez dentro da planta, as bactérias endofíticas podem colonizá-la em tecidos específicos ou sistemicamente (Hurek et al., 1994; Quadt-Hallmann et al., 1997b; Patriquin & Dobereiner, 1978). O local de colonização específico de determinado isolado de bactéria endofítica parece sofrer influência da espécie do

hospedeiro. Porém, em sua grande maioria, as bactérias endofíticas colonizam os espaços intercelulares (Dong et al., 1994; Hinton & Bacon, 1995; Hurek et al., 1994; Patriquin et al., 1983). Apesar de não ser tão comum, também existem relatos mostrando a colonização intracelular (Frommel et al., 1991; Hurek et al., 1994; Quadt-Hallmann et al., 1997a). No interior do hospedeiro, as fontes nutricionais das bactérias endofíticas estão nos íons K, Ca e, ocasionalmente, pequenas quantidades de S, P e Cl nos espaços intercelulares (Canny & Huang, 1993)

Uma estimativa adequada da densidade populacional das bactérias endofíticas é difícil devido à sua distribuição heterogênea pelos tecidos do hospedeiro (Dong et al., 1994). Entretanto, segundo alguns trabalhos, existe um nível populacional ótimo de bactérias endofíticas suportado pelo hospedeiro, o qual flutua dependendo da idade e da espécie da planta (Hallmann et al., 1997). Normalmente, as bactérias endofíticas são mais abundantes em raízes e partes baixas de colmos e caules, decrescendo em direção à parte superior da planta, sendo, em média, 10^2 a 10^6 UFC/g de matéria fresca (Dong et al., 1994; Frommel et al., 1991; Quadt-Hallmann & Klopper, 1996; Pleban et al., 1995). Trata-se de uma população menor comparada à de bactérias fitopatogênicas.

As bactérias endofíticas também são encontradas em baixa concentração no sistema vascular, o que as caracteriza e diferencia das bactérias fitopatogênicas sistêmicas. Entretanto, ainda não se sabe se este serve apenas como um meio de transporte para as endofíticas ou se elas também se multiplicam em seu interior (Hallmann et al., 1997).

2.4 Promoção de crescimento de plantas por bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas têm sido associadas à promoção de crescimento em diversas culturas, incluindo tomate e alface (Bashan et al., 1989; van Peer & Schippers, 1989), batata (Frommel et al., 1991; Sturtz, 1995; van Peer &

Schippers, 1989), milho (Hinton & Bacon, 1995; Lalande et al., 1989), pepino (van Peer & Schippers, 1989; Kloepper et al., 1992b), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989).

De acordo com Sturtz (1995), aproximadamente 10% das bactérias endofíticas isoladas de tubérculos de batata promoveram o crescimento das plantas. A introdução do isolado BH72 da bactéria endofítica diazotrófica *Azoarcus* sp. em plantas de arroz também resultou em crescimento significativo das plantas (Hurek et al., 1994).

Os efeitos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da raiz e do caule e na formação de pêlos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (Frommel et al., 1991; Sturtz, 1995; Pillay & Nowak, 1997). Segundo Frommel et al. (1991), o isolado não fluorescente de *Pseudomonas* sp., PSJN, aumentou significativamente o número de raízes (24% a 196%), o peso da matéria seca da raiz (44% a 201%), o comprimento do caule (26% a 28%) e a formação de pêlos foliares (55% a 110%) de plantas de batata.

Os principais mecanismos pelo quais as bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas são a fixação de nitrogênio (Boddey & Dobereiner, 1995) e o controle biológico de fitopatógenos, seja este pelo antagonismo direto ou pela indução de resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997). No entanto, as bactérias endofíticas também podem promover o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais ou de substâncias análogas a estes reguladores de crescimento (Arshad & Frankenberger, 1991; Bashan & Holguin, 1997; Hallmann et al., 1997; Lazarovits & Nowak, 1997). Estes fitormônios atuam diretamente na alongação e diferenciação celular, na emissão de raízes, no florescimento e no amadurecimento dos frutos.

Alguns isolados endofíticos de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter* e *Azospirillum* sintetizam reguladores de

crescimento, como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno, sugerindo a produção de fitormônios como mecanismo direto envolvido na promoção de crescimento (Arshad & Frankenberger, 1991; Bashan & Holguin, 1997).

Um outro fator que contribui para o crescimento das plantas é a capacidade de algumas bactérias endofíticas em aumentar a absorção de nutrientes minerais e água e melhorar a disponibilização destes nutrientes (Hallmann et al., 1997; Lazarovits & Nowak, 1997).

O gênero *Azospirillum*, além de ser diazotrófico, isto é, ser capaz de fixar o nitrogênio atmosférico, também secreta fitormônios, principalmente auxinas e promove o aumento da absorção de nutrientes e água com conseqüente crescimento da planta (Schloter & Hartmann, 1998).

Por outro lado, Kloepper et al. (1991) verificaram que a promoção de crescimento também pode ocorrer indiretamente, devido à supressão da microflora deletéria pela introdução de bactérias endofíticas. van Peer & Schippers (1989) observaram que plântulas de tomate tratadas com o isolado WCS417r de *Pseudomonas* sp. aumentaram tanto o crescimento das plantas quanto a população do antagonista. Segundo os autores, a densa colonização do isolado deslocou os organismos deletérios ao crescimento das plantas. De maneira semelhante, Shishido et al. (1995) verificaram que isolados endofíticos de *Bacillus* sp. e de *Streptomyces* sp. estimularam o crescimento de mudas de coníferas, controlando os organismos responsáveis pela inibição do seu crescimento.

2.5 Bactérias endofíticas no controle biológico de patógenos

As bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante ao dos patógenos de plantas, o que pode favorecê-las como potenciais candidatas a agentes de biocontrole (Kloepper et al., 1992b).

Hinton & Bacon (1995) isolaram a endofítica *Enterobacter cloacae* de milho e observaram inibição *in vitro* à atividade de *Fusarium moniliforme*. De maneira semelhante, Mukhopadhyay et al. (1996) verificaram que diversas bactérias endofíticas isoladas de sementes de arroz exibiram forte atividade antifúngica *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaeumannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum*. Bell et al. (1995) verificaram que vários isolados endofíticos provenientes de seiva de videira apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra *Agrobacterium vitis*.

Brooks et al. (1994) selecionaram isolados de bactérias endofíticas capazes de inibir *in vitro* o agente causal da murcha do carvalho, *Ceratocystis fagacearum*. Quando estes isolados foram testados em casa de vegetação, seis reduziram a incidência da doença em 39% e um deles, identificado como *Pseudomonas denitrificans*, em 50%.

Os isolados endofíticos identificados como *Aureobacterium saperdae* (INR-6), *Bacillus pumilus* (JM-1128), *Phyllobacterium rubiacearum* (JM-1137), *P. putida*, isolados CE-186 e 89B-61 e *Burkholderia solanacearum* (JM-869) proporcionaram o biocontrole da murcha de fusário em algodoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Chen et al., 1995).

Bacillus prumilus, *B. cereus* e *B. subtilis*, provenientes de diferentes hospedeiros, introduzidos em mudas de algodão e feijão, promoveram reduções significativas na incidência de *damping-off* (*Rhizoctonia solani*) e murcha de Sclerotium (*Sclerotium rolfsii*), com variações de 46% a 56% e 26% a 79%, respectivamente (Pleban et al., 1995).

A introdução da endofítica *E. cloacae* (SM10) em sementes de espinafre resultou em maior proteção contra *F. oxysporum* f.sp. *spinaciae* (Tsuda et al., 2001).

Com relação às doenças bacterianas, as endofíticas foram eficientes agentes de biocontrole em patossistemas como *Xanthomonas campestris* pv.

oryzae (Poon et al., 1977), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (van Buren et al., 1993) e *Erwinia catotovor*a var *atroseptica* (Sturtz & Matheson, 1996), ambas em batata.

Bactérias endofíticas do gênero *Erwinia* isoladas de plantas de soja protegeram o hospedeiro contra o crestamento bacteriano, causado por *P. syringae* pv. *glycineae* (Volksch et al., 1992).

A eficiência de bactérias endofíticas também foi testada para o biocontrole de doenças de pós-colheita. Segundo Pratella et al. (1993), bactérias endofíticas isoladas de pepino, berinjela, pimentão, tomate, abóbora, abricó, pêsego e ameixa, proporcionaram mais de 90% de controle para as doenças de pós-colheita incitadas por *Monilinia laxa* e *Rhizopus stolonifer* em pêra.

Há evidências de que bactérias endofíticas também controlam nematóides fitoparasitas (Hallmann et al., 1995) e insetos (Dimock et al., 1988). No entanto, o controle desses parasitas parece ser mais complexo e difícil do que o de fungos ou bactérias, uma vez que os danos causados por nematóides e insetos ocorrem como resultado de seu hábito alimentar e da migração interna, limitando assim a eficiência do antagonismo bacteriano (Hallmann et al., 1997). Todavia, nematóides sedentários podem ser alvo interessante para o antagonismo endofítico, pois permanecem dentro da planta por várias semanas e alimentam-se em um único local (Hallmann et al., 1997).

Hallmann et al. (1995) relataram que as bactérias endofíticas *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. vesicularis*, *Serratia marcescens* e *Sphingomonas paucimobolis* reduziram em até 50% a infecção de *Meloidogyne incognita* em plantas de pepino.

No Brasil, também existem trabalhos de controle biológico sendo desenvolvidos com bactérias endofíticas. Assis et al. (1998), estudando o potencial antagonico de *Kluyvera ascorbata* no controle de *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra em repolho, verificaram 71% de

redução da incidência e 77% da severidade da doença, em casa de vegetação e em campo, respectivamente. Nascimento (1998), utilizando bactérias endofíticas isoladas de *Ipomea* sp., obteve, em casa de vegetação, redução significativa na incidência da murcha e do cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) bacteriano do tomateiro. Naves et al. (2004) conseguiram reduzir a formação de galhas e a reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro, com a utilização de bactérias endofíticas. Barretti (2001) verificou a eficiência de quatro isolados endofíticos obtidos de tomateiro no controle da pinta preta (*Alternaria solani*), da requeima (*Phytophthora infestans*) e da murcha bacteriana em tomateiro. Campos et al. (2002), constataram, em tomateiro que cinco isolados de bactérias endofíticas controlaram a mancha (*X. vesicatoria*) e dois a pinta bacteriana (*P. syringae* pv. *tomato*).

Os mecanismos de controle envolvidos na ação de bactérias endofíticas ainda não estão bem conhecidos, entretanto, sabe-se que a antibiose pela produção de substâncias antimicrobianas, a competição por nutrientes e por nichos ecológicos e a indução de resistência sistêmica estão envolvidas (Lambert et al., 1987; Murhofer et al., 1992; Liu et al., 1995a; b; c; van Peer et al., 1990).

2.6 Indução de resistência

A indução de resistência é definida como o aumento da capacidade de defesa da planta contra amplo espectro de patógenos e pragas, adquirida após um estímulo apropriado (van Loon et al., 1998; Knoester et al., 1999; Ramamoorthy et al., 2001).

A resistência pode ser ativada por agentes indutores abióticos ou bióticos, tais como moléculas sintetizadas ou químicas, não patógenas, formas avirulentas de patógenos, raças incompatíveis de patógenos ou patógenos virulentos (van Loon et al., 1998) e geralmente é caracterizada pela redução no

tamanho e ou no número de lesões desenvolvidas após a inoculação da planta induzida com formas virulentas do patógeno (Hammerschmidt, 1999). Esta resistência é expressa localmente no sítio de ataque do patógeno e, sistemicamente, em partes da planta não infectadas (Mauch-Mani & Métraux, 1998).

A resistência induzida a patógenos pode ser dividida em duas amplas categorias: a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) (van Loon et al., 1998).

2.6.1 Resistência sistêmica adquirida (SAR)

A resistência sistêmica adquirida (SAR) é caracterizada pela proteção contra ampla gama de patógenos, pelo aumento inicial no ácido salicílico (AS) sintetizado endogenamente e concomitante ativação de genes codificadores de PR proteínas (Ryals et al., 1996; Pieterse et al., 1996; van Loon, 1997; Oostendorp et al., 2001), as quais são freqüentemente usadas como marcadores para o estado induzido (Knoester et al., 1999).

Além do AS, vários químicos foram descobertos e parecem atuar em diversos pontos nas vias de ativação de defesa de plantas, imitando parte ou toda a ativação biológica da resistência. Dentre esses, encontram-se o probenazole (PBZ), o ácido 2,6-dicloroisonicotínico, o ácido 2,6-dicloroisonicotínico metil éster (INA), o benzo (1,2,3) tiadiazole-7 ácido carbotióico S-metil éster (acibenzolar-S-metil) entre outros, porém, poucos atingiram a comercialização (Oostendorp et al., 2001).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência mais estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes de Bion®, Actigard™ e Boost® (Venâncio et al., 2000). Trata-se de uma molécula exógena sinalizadora de reações de defesa rapidamente absorvida e translocada sistemicamente em

plantas. Pode imitar o AS na via de sinalização natural de SAR, desencadeando uma série de eventos que ativarão genes de defesa (Oostendorp et al., 2001).

No Brasil, esta molécula vem sendo testada em cacau, tomate, citros, café, feijão, algodão e em outras culturas, apresentando resultados promissores no controle de fungos e bactérias. Na cultura do tomate, na qual se concentra grande parte dos estudos, o ASM não teve efeito direto *in vitro* sobre seus principais patógenos bacterianos, *X. vesicatoria*, *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato*, mesmo nas maiores concentrações (Kobayashi et al., 2001). Entretanto, em experimentos conduzidos em casa de vegetação, o ASM foi eficaz no controle de *R. solanacearum* e *X. vesicatoria* em tomateiro. Silva et al. (2001a) verificaram redução na incidência da murcha bacteriana do tomateiro após duas pulverizações foliares (2,5 g i.a./100 L). Para o controle de *X. vesicatoria*, observou-se redução na severidade da mancha em torno de 50% a 60% em relação à testemunha, após três pulverizações do produto (Silva et al., 2001b; 2003a; b). Em experimentos conduzidos em campo, Castro et al. (2000; 2001) verificaram que a aplicação de ASM proporcionou significativa redução nos sintomas de requeima, pinta preta, septoriose e murcha bacteriana em tomateiro, além de aumentos na produção e qualidade dos frutos, quando comparados ao programa padrão do agricultor.

Em feijão, o ASM foi eficaz no controle de *Phaeoisariopsis griseola* e *X. campestris* pv. *phaseoli* (Romeiro et al., 1999; Jesus Júnior et al., 1999). No entanto, não teve eficiência para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Soares & Maringoni, 2002).

2.6.2 Resistência sistêmica induzida (ISR)

Alguns agentes de controle biológico também são capazes de reduzir doenças por meio de um mecanismo mediado pela planta que é fenotipicamente

similar à SAR induzida pelo patógeno, em que a resistência induzida é sistemicamente ativada e se estende às partes aéreas da planta (Pieterse et al., 2001). Este tipo de resistência induzida, ativada por não patógenos, é referida como resistência sistêmica induzida (ISR) (van Loon et al., 1998).

A ISR foi demonstrada em muitas plantas, como: feijão, cravo, pepino, rabanete, fumo, tomate e na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sendo efetiva contra amplo espectro de patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus (van Loon et al., 1998).

Para provar que a resistência é induzida é verdadeiramente sistêmica, as bactérias indutoras devem estar ausentes do local do desafio com o patógeno e não entrar em contato direto com o patógeno desafiador durante o experimento (Hoffland et al., 1997; van Loon et al., 1998). Steiner & Schönbeck (1995) formularam os seguintes critérios para distinguir resistência induzida de outros mecanismos que podem reduzir a incidência ou severidade da doença:

- 1) supressão da resistência induzida por uma prévia aplicação de inibidores específicos;
- 2) ausência de efeitos tóxicos do agente indutor no patógeno desafiador;
- 3) necessidade de intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o início de proteção na planta;
- 4) ausência de correlação típica entre dose e resposta conhecida para componentes tóxicos;
- 5) não especificidade de proteção;
- 6) proteção local, bem como sistêmica;
- 7) dependência do genótipo da planta.

Estes critérios são úteis para comparar as características da ISR mediada por microrganismos antagonistas e SAR (van Loon et al., 1998).

2.6.2.1 Resistência sistêmica induzida por bactérias endofíticas

Embora existam poucos estudos de indução de resistência e endofíticas, van Peer et al. (1990) foram os primeiros a demonstrar resistência sistêmica induzida por bactérias endofíticas. Para tanto, o isolado WCS417r de *P. fluorescens* foi introduzido no sistema radicular de cravo e, posteriormente, colonizou os tecidos internos das raízes. Após uma semana, o caule das plantas foi inoculado com o patógeno desafiante *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. As plantas tratadas com a endofítica desenvolveram os sintomas da doença com menor intensidade do que as plantas controle. Como ocorreu a separação espacial entre o local onde o agente indutor foi aplicado e o sítio de inoculação do patógeno, os autores concluíram que se tratava de um caso de resistência sistêmica induzida.

Os isolados 89B-27 de *P. fluorescens* e 90-166 de *S. marcescens* foram observados como indutores de resistência à *P. syringae* pv. *lachrymans*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerium* e *Colletotrichum orbiculare* em pepino (Liu et al., 1995a; b; c).

Em trabalhos como o de Soares (2000), nos quais foram testados isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados como agentes de biocontrole da “vassoura-de-bruxa” em cacauero, verificou-se que o isolado 3R4B1, identificado como *B. subtilis*, controlou a doença e induziu resistência sistêmica no clone susceptível (Catongo), demonstrada pelo aumento na atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase e no teor de proteínas totais.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Academic, 2005. 922p.
- AKIEW, E.; TREWORROW, P.R. Managment of bacterial wilt of tobacco. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p.179-198.
- ANURATHA, C.S.; GNANAMANICKAM, S.S. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v124, p.109-116, 1990.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Microbiol production of plant hormones. In: KEISTER, D.L., CREGAN, P.B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.327-334.
- ASSIS, S.M.P. et al. Bactérias endofíticas-Método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, p.216-220, 1998.
- BARRETTI, P.B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencialidade para o biocontrole de enfermidades do tomateiro**. 2001. 38p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y. et al. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p.1317-1324, 1989.
- BELL, C.R. et al. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.46-53, 1995.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and Ri T-DNA transformed pea roots: host response to colonization by *Pythium ultimum* Trow. **Planta**, v.199, p.105-117, 1996.

BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Fertilizers Res.**, v.42, p.241-250, 1995.

BRINGEL, J.M.M. Colonização de raízes de plantas cultivadas por *Pseudomonas solanacearum* biovars I, II e III em condições de casa de vegetação e “in vitro”. 1997. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

BROOKS, D.S. et al. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, San Diego, v.4, p.373-381, 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 (*Xanthomonas vesicatoria*) e à mancha bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.57, 2002. (Suplemento).

CANNY, M.J.; HUANG, C.X. What is in the intercellular spaces of roots? Evidence from the cryo-analytical-scanning electron microscopy. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.561-568, 1993.

CASTRO, R.M. et al. Redução na severidade de doenças e incremento da produção e qualidade dos frutos de tomate estaqueado em áreas comerciais através da aplicação do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.324, 2000. (Suplemento).

CASTRO, R.M. et al. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.492, 2001. (Suplemento).

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

CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v.5, p.83-91, 1995.

COLLMER, A.; BERMAN, P.; MOUNT, M.S. Pectate lyase regulation and bacterial soft-rot pathogenesis. In: MOUNT, M.S.; LACY, G.H. (Ed.) **Phytopathogenic prokaryotes**. New York: Academic, 1992. p.395-422.

De WIT, P.J.G.M.; SPIKMAN, G. Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. **Physiological Plant Pathology**, Washington, v.21, p.1-11, 1982.

DIMOCK, M.B.; BEACH, R.M.; CARLSON, P.S. Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agents. In: ROBERTS, D.W.; GRANDOS, R.R. (Ed.). **Biotechnology, biological plant pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management**. Ithaca: Boyce Thompson Institute for Plant Research, 1988. p.88-92.

DONG, Z. et al. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.1139-1147, 1994.

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

GOTO, M. **Fundamental of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic, 1992. 342p.

GRIMAULT, V.; ANAIA, G.; PRIOR, P. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissue of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, p.663-668, 1994.

HALLMANN, J. et al. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.1136, 1995.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, p.77-84, 1999.

HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.27, p.265-277, 1964.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.65-87, 1991.

- HAYWARD, A.C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p.9-24.
- HINTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v.129, p.117-125, 1995.
- HOLLIS, J.P. Bacteria in healthy potato tissue. **Phytopathology**, Madison, v.41, p.350-367, 1951.
- HOFFLAND, E.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN LOON, L.C. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, p.138, 1997.
- HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.
- JESUS JUNIOR, W.C. et al. Um derivado benzotriazolínico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.293, 1999. (Suplemento).
- KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p.660-662.
- KELMAN, A.; HARTMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. 259p.
- KELMAN, A.; JENSEN, J.H. Maintaining virulence in isolates of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.41, p.185-187, 1951.
- KELMAN, A.; SEQUEIRA, L. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.55, p.304-309, 1965.
- KLOEPPER, J.W.; SCHIPPERS, B.; BAKKER, P.A.H.M. Proposed elimination of the term endorhizosphere. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.726-727, 1992a.

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

KLOEPPER, J.W. et al. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Ed.) **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.315-326.

KNOESTER, M. et al. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.12, p.720-727, 1999.

KOBAYASTI, L et al. Efeito *in vitro* do indutor de resistência acibenzolar-S-metil sobre bactérias patogênicas ao tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.293, 2001. (Suplemento).

LALANDE, R. et al. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant growth-promoting potencial. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, p.7-11, 1989.

LAMBERT, B. et al. Rhizobacteria of maize and their fungal activities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.1866-1871, 1987.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, Alexandria, v.32, p.188-192, 1997.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.695-698, 1995a.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.843-847, 1995b.

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

- LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p.56-60, 1999.
- MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, London, v.82, p.535-540, 1998.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.173, p.337-342, 1995.
- MELTON, T.; POWELL, N.T. Effects of two-year crop rotations and cultivar resistance on bacterial wilt in flue-cured tobacco. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.1367-1372, 1991.
- MICHEL, V.; HARTMAN, G.L.; MIDMORE, D.J. Effect of previous crop on soil population of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.1367-1372, 1996.
- MUKHOPADHYAY, N.K. et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v.134, p.151-159, 1996.
- MURHOFER, M. et al. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.190-195, 1992.
- NASCIMENTO, A.S. **Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro**. 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.384-388, 2004.
- OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.19-28, 2001.
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, p.734-742, 1978.

- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasse. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.900-915, 1983.
- PIETERSE, C.M.J et al. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1225-1237, 1996.
- PIETERSE, C.M.J. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.51-61, 2001.
- PILLAY, V.J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.354-361, 1997.
- PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.101, p.665-672, 1995.
- POON, E.S.; HUANG, T.C.; KUO, T.T. Possible mechanism of symptom inhibition of bacterial blight of rice by an endophytic bacterium isolated from rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.18, p.61-70, 1977.
- PRATELLA, G.C. et al. Preliminary studies on the efficiency of endophytes in the biological control of the postharvest pathogens *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.361-368, 1993.
- QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.577-582, 1997a.
- QUADT-HALLMMAN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.254-259, 1997b.

- QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p.1144-1154, 1996.
- QUISPTEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. In: VERMA, D.P.S. (Ed.) **Molecular signals in plant-microbe communications**. Boca Raton: CRC, 1992. p.471-490.
- RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v.20, n.1, p.1-11, 2001.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil - aspectos epidemiológicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.2, p.213, 1985.
- ROMEIRO, R.S. et al. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. campestris* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.255, 1999. (Suplemento).
- RYALS, J.A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, n.10, p.1809-1819, 1996.
- SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v.25, p.159-179, 1998.
- SHISHIDO, M.; LOEB, B.M.; CHANWAY, C.P. External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.707-713, 1995.
- SILVA, L.H.C.P. et al. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.294, 2001a. (Suplemento).
- SILVA, L.H.C.P. et al. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-s-metil (BTH) contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em cinco genótipos de tomateiro industrial. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.119, 2001b.

SILVA, L.H.C.P. et al. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.2, p.177-181, 2003a.

SILVA, L.H.C.P. et al. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.3, p.244-248, 2003b.

SOARES, F.M.P. Isolamento e seleção de microrganismos endofíticos com potencial para controle de *Crinipellis perniciosa* em cacau (*Theobroma cacao* L.) e monitoramento da atividade β -1,3 glucanase e quitinase. 2000. 88p. Tese (Doutorado em Microbiologia)–Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-s-methyl sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.41-45, 2002.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocts. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Ed.). **Induced resistance to disease in plants: developments in plant pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.86-110.

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

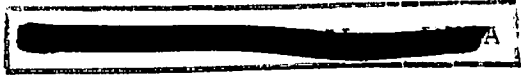
STURTZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

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

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.170-177, 1997.

THOMAS, W.D.; GRAHAM, R.W. Bacteria in apparently healthy pinto beans. **Phytopathology**, Madison, v.42, p.214, 1952.

- TSUDA, K. et al. Evaluation of the endophytic *Enterobacter cloacae* SM10 isolated from spinach roots for biological control against *Fusarium* wilt of spinach. **Journal of General Plant Pathology**, v.67, p.78-84, 2001.
- 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.
- van LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.103, p.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, 1998.
- van PEER, R.; NIEMANN, G.J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.728-734, 1990.
- van PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.456-463, 1989.
- VAUGHAN, E.K. Bacterial wilt of tomato caused by *Phytomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Madison, v.34, n.5, p.443-458, 1944.
- VENÂNCIO, W.S. et al. Novos fungicidas. II - famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.59-92, 2000.
- VIANA, E.C.G.M. **Estudos da sobrevivência de um isolado variante de *Pseudomonas solanacearum* em raízes de plantas cultivadas.** 1995. 61p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**, v.24, p.305-311, 1992.



YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology Group II to the New Genus, with the type species *Burkholderia cepacea* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**. Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E. et al. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pichettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.39, p.897-904, 1995.



CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATEIRO E COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DA MURCHA BACTERIANA

1 RESUMO

BARRETTI, Patrícia Baston. Isolamento e seleção de bactérias endofíticas como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro e como agentes de biocontrole da murcha bacteriana. In: _____. **Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por associação: endofítia, resistência induzida e varietal.** 2005. Cap.2, p.34-69. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - UFLA, Lavras, MG.*

Foram obtidos 150 isolados bacterianos de folhas, caules e raízes de tomateiros sadios empregando-se técnicas de isolamento específicas para bactérias endofíticas. Para a introdução das bactérias endofíticas, plântulas de tomateiro cv. Santa Clara foram seccionadas na região do hipocótilo ao apresentar o segundo par de folhas definitivas. O sistema radicular foi descartado e o restante da planta imerso em suspensão de células de cada isolado endofítico. A seguir, as seções de parte aérea foram plantadas em vasos contendo solo esterilizado e mantidas em casa de vegetação, aguardando-se o enraizamento. Dez dias após o transplante, mediu-se a altura das plantas, do ponto de inserção das folhas cotiledonares até o ápice. Em seguida, procedeu-se a infestação do solo com *Ralstonia solanacearum*. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. A severidade da murcha bacteriana foi avaliada a cada cinco dias e, após a sexta avaliação calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Cinquenta e três isolados proporcionaram variáveis graus de promoção de crescimento e 48 reduziram a severidade da doença em relação à testemunha e aos demais tratamentos. Do total de 150 isolados de bactérias endofíticas, foram selecionados dez, UFV-E17, UFV-E22, UFV-E25, UFV-E26, UFV-E27, UFV-E29, UFV-E49, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS e UFLA 11-LS, como promotores de crescimento e dois, UFV-E34 e UFLA 25-LS, como agentes de controle biológico da murcha bacteriana, os quais proporcionaram as maiores alturas e porcentagens de controle da doença em relação à testemunha. Dos isolados selecionados, somente três apresentaram efeito inibitório direto *in vitro* a *R. solanacearum*, sugerindo ter havido indução de resistência nos demais casos. Foi realizada a caracterização parcial dos isolados selecionados.

*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV e Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

BARRETTI, Patrícia Baston. Isolation and selection of endophytic bacteria as tomato growth promoters and agents of biocontrol of bacterial wilt. In: _____. **Tomato bacterial wilt and possibilities of its control through the association of endophytic bacteria and induced and variety resistance.** 2005. Chap.2, p.34-69. Thesis (Doctorate in Phytopathology) - UFLA, Lavras, MG.*

One hundred and fifty bacterial isolates were obtained from leaves, stems and roots of healthy tomatoes using specific isolation techniques for endophytic bacteria. The application of the endophytic bacteria was made on tomatoes seedlings cv. Santa Clara with the second pair of definitive leaves, on cuts, in the region of the hypocotyls. The root was discarded and the upper portion of the cut seedlings was immersed in each endophytic isolate suspension. Then, the seedlings were planted in pots containing sterilized soil and maintained in greenhouse up to emission of new roots. Ten days after the seedlings transplantation, the height of the plants was measured, from the insertion of cotyledon leaves to the apex. After that, a cell suspension of *Ralstonia solanacearum* was inoculated in the pots by soil drenching. Bacterial wilt severity was assessed every five days. After the sixth assessment, the area under disease progress curve (AUDPC) was calculated. Fifty three isolates provided variable rates of growth promotion and 48 isolates reduced disease severity when compared to untreated plants and to other treatments. From 150 endophytic bacteria isolates, ten, UFV-E17, UFV-E22, UFV-E25, UFV-E26, UFV-E27, UFV-E29, UFV-E49, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS and UFLA 11-LS, were selected as plant growth promoters and two, UFV-E34 and UFLA 25-LS, as biological control agents of the bacterial wilt. Plants treated with those strains presented the largest heights and percentages of disease control in relation to untreated plants. From the selected isolates, only three presented antimicrobial activity against *R. solanacearum*, suggesting that in the other cases resistance induction would be responsible for the disease control. The selected strains were partially characterized.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Avdiser), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV and Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas saudáveis por bactérias datam de 1870, com os trabalhos de Pasteur e de outros pesquisadores (Hollis, 1951). Contudo, foi Perotti, em 1926, quem descreveu essa relação natural entre as bactérias nativas e seus hospedeiros, denominando-as de endofíticas (Hallmann et al., 1997). Desde então, há relatos de bactérias endofíticas nativas em diferentes tecidos, incluindo sementes e óvulos (Mundt & Hinkle, 1976), tubérculos (Tervet & Hollis, 1948), raízes (Philipson & Blair, 1957), hastes, folhas e frutos (Samish et al., 1961) de plantas de várias espécies. No entanto, os primeiros relatos as consideravam como contaminantes resultantes da desinfestação superficial incompleta ou como patógenos fracamente virulentos (Hollis, 1951; Thomas & Graham, 1952). Porém, em 1997, Hallmann et al. consideraram como endofítica a bactéria que pode ser isolada de um tecido de planta desinfestado superficialmente ou então extraída de dentro da planta e que, aparentemente, não cause dano ao hospedeiro.

Pesquisas recentes demonstram que bactérias endofíticas podem promover o crescimento de plantas e reduzir sintomas de doenças causadas por diversos patógenos (van Peer & Schippers, 1989; Frommel et al., 1991; Chen et al., 1995; Pleban et al., 1995).

As bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante ao dos patógenos de plantas, o que pode favorecê-las como potenciais candidatas a agentes de controle biológico (Kloepper et al., 1992). Além disso, por colonizarem o interior dos tecidos, possuem vantagens no que tange à sobrevivência, pois ficam menos expostas à ação dos antagonistas da microbiota do solo e às condições adversas do meio ambiente, como flutuações de temperatura e umidade e exposição à radiação ultravioleta (Hallmann et al., 1997).

Considerando como alvo as doenças fúngicas, as endofíticas foram eficientes agentes de biocontrole em patossistemas como *Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum* e *Rhizoctonia solani* em algodão (Chen et al., 1995), *R. solani* e *Sclerotium rolfii* em feijão (Pleban et al., 1995), *Ceratocystis fagacearum* em carvalho (Brooks et al., 1994) e *Pythium myriotylum*, *R. solani*, *Gaeumannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum* em arroz (Mukhopadhyay et al., 1996).

Com relação às doenças bacterianas, as endofíticas foram eficientes como agentes de biocontrole de *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* em arroz (Poon et al., 1977), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* e *Erwinia catotovor* var *atroseptica* em batata (van Buren et al., 1993; Sturtz & Matheson, 1996).

No Brasil, as bactérias endofíticas têm sido estudadas no controle de *X. campestris* pv. *campestris* em repolho (Assis et al., 1998), *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Meloidogyne javanica*, *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans* em tomateiro (Nascimento, 1998; Naves, 2004; Barretti, 2001).

As bactérias endofíticas têm sido associadas à promoção de crescimento de diversas culturas, incluindo tomate e alface (Bashan et al., 1989; van Peer & Schippers, 1989), batata (Frommel et al., 1991; Sturtz, 1995; van Peer & Schippers, 1989), milho (Hinton & Bacon, 1995; Lalande et al., 1989), pepino (van Peer & Schippers, 1989), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos isolar e selecionar bactérias endofíticas capazes de controlar a murcha bacteriana e promover o crescimento de plantas de tomateiro, avaliar o efeito *in vitro* destes isolados sobre *R. solanacearum* e caracterizar parcialmente os isolados selecionados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação dos experimentos

Parte dos isolados de bactérias endofíticas foi obtida no Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e parte no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os experimentos foram instalados e conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Lavras, MG.

4.2 Obtenção do isolado de *Ralstonia solanacearum* e classificação em biovar

O isolado Rs-Cmd de *R. solanacearum* foi obtido da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da UFLA, sendo proveniente de plantas de batata coletadas no município de Camanducaia, MG. Para o preparo do inóculo, o isolado foi transferido para placas de Petri contendo o meio 523 de Kado & Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas, incubado a 28°C por 48 horas e, em seguida, submetido ao teste de patogenicidade. Vinte e um dias após a semeadura, em casa de vegetação, plântulas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram inoculadas pelo método de imersão das raízes em suspensão bacteriana (Winstead & Kelman, 1952) e, posteriormente, transplantadas para vasos com capacidade de 1,5kg contendo solo. Sete dias após o transplante, plantas com sintoma de murcha foram submetidas ao “teste do copo”. Observada a exsudação cortaram-se as hastes das plantas em pequenas seções, as quais foram desinfestadas superficialmente em álcool etílico (70%) por trinta segundos e em hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto e lavadas em água destilada esterilizada. A seguir, as seções foram

colocadas perpendicularmente em placas de Petri, com a extremidade imersa em água destilada esterilizada para que ocorresse a exsudação. Após 10 minutos, observada a exsudação bacteriana, fez-se a repicagem, pelo método de estrias paralelas, em placas de Petri contendo meio de cultura 523. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

A identificação do isolado em nível de biovar foi feita por meio dos testes de utilização de açúcares (maltose, lactose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), segundo a metodologia de Hayward (1964) (Tabela 1).

Uma pequena porção do isolado, cultivado em meio 523 por 48 horas, foi inoculada no centro de tubos com meio de cultura contendo os açúcares e álcoois. Tubos sem a inoculação com *R. solanacearum* foram usados como controle. Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento a 28°C durante 21 dias, quando foram feitas as leituras. Reações positivas foram caracterizadas pela mudança da coloração do meio de verde-azulada para amarela e negativas quando a coloração original do meio não era alterada. Foram preparados cinco tubos de ensaio para cada açúcar e álcool.

4.3 Coleta de plantas de tomateiro sadias

Plantas de tomateiro provenientes de plantios convencionais e hortas orgânicas foram coletadas em diferentes localidades nos municípios de Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci, Bom Sucesso, Nepomuceno, Três Pontas e Viçosa, no estado de Minas Gerais, dando-se preferência para as aparentemente sadias.

TABELA 1: Caracterização de biovares de *Ralstonia solanacearum*, segundo Hayward (1964)

Fonte de carbono	Biovares				
	I	II	III	IV	V
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
Celobiose	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	+	-

+: Reação positiva; -: Reação negativa

4.4 Isolamento de bactérias endofíticas de folhas e caules de tomateiro

Folhas e caules das plantas sadias de tomateiro previamente coletadas, foram lavadas em água de torneira e enxugadas com papel absorvente. Em seguida, foi feita a desinfestação superficial com álcool a 50%, por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2%, por 6 minutos e lavagem em água destilada esterilizada, por três vezes. Os fragmentos do tecido foram macerados em água estéril e o macerado deixado em repouso por 15 minutos, para a difusão das bactérias para a solução (Romeiro, 2001). Após esse período, as suspensões bacterianas obtidas foram semeadas, pelo método de estrias paralelas, em placas contendo o meio 523 e incubadas a 28°C. Foram preparadas cinco placas para cada fragmento macerado. Todas as colônias surgidas foram repicadas para tubos de ensaio, contendo o meio 523.

Para verificar a eficiência da desinfestação superficial dos fragmentos e confirmar a natureza endofítica dos isolados, utilizou-se uma contraprova. A metodologia empregada foi a descrita por Assis et al. (1998), porém, com algumas modificações, como se segue. O fragmento de planta, após a terceira lavagem em água destilada esterilizada, foi seccionado em duas partes. Uma

delas foi macerada, conforme já descrito. A outra foi mergulhada rapidamente em tubo de ensaio contendo o meio 523 líquido e imediatamente descartada. O material no tubo de ensaio também foi incubado a 28°C e observado, a fim de se comprovar a ausência de crescimento de organismos epifíticos. Não havendo crescimento bacteriano nesses tubos de ensaio, os isolados obtidos pela maceração dos tecidos foram considerados endofíticos.

4.5 Isolamento de bactérias endofíticas de raízes de tomateiro

As raízes sadias foram cuidadosamente lavadas em água de torneira, para eliminar o solo aderido a elas, transferidas para frascos contendo solução tampão fosfato-potássio (PB) 0,02M esterilizada (pH 7,0) e submetidas a agitação vigorosa em agitador orbital por 1 hora. Essa operação foi repetida por quatro vezes, após a troca da solução PB. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a desinfestação superficial das raízes com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, seguida de 3 lavagens em solução PB esterilizada.

Para desalojar da superfície do material vegetal as bactérias epifíticas remanescentes, as raízes foram transferidas para frascos contendo solução PB 0,02M esterilizada (pH 7,0) e submetidas a banho de ultra-som por 10 minutos. Nova desinfestação superficial das raízes foi feita em hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, seguida de 3 lavagens em solução PB esterilizada. A seguir, as raízes foram novamente transferidas para frascos contendo solução PB esterilizada e submetidas a novo banho de ultra-som por mais 10 minutos.

A trituração das raízes foi feita em almofariz e pistilo esterilizados contendo PB e o triturado novamente submetido a banho de ultra-som por 10 minutos, desta vez para desagregação das partículas e células bacterianas. Procedeu-se a homogeneização do triturado e posterior diluição em série em

solução PB com fator diluição 1:10. Alíquotas de 100µl das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} foram então retiradas e transferidas para placas de Petri contendo meio “tryptic soy agar” (TSA – Difco) e espalhadas com alça de Drigalsky.

Foram preparadas cinco placas para cada diluição, as quais foram incubadas a 28°C durante 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 paralelas, visando à obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, foram transferidas para tubos de ensaio com meio TSA inclinado.

Para confirmar a natureza endofítica dos isolados utilizou-se um controle. Para isso, alíquotas de 100µl da solução de PB utilizada após o segundo banho de ultra-som foram transferidas para placas 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 raízes foram considerados endofíticos (Naves, 2004).

4.6 Cultivo e preservação das culturas bacterianas obtidas

As culturas bacterianas foram cultivadas em meio 523 e preservadas em peptona-glicerol a -80°C.

4.7 Introdução das bactérias endofíticas em plantas de tomateiro

A técnica eleita foi o corte do hipocótilo, descrita e patenteada por Kijima et al. (1995), como se segue. Plântulas de tomateiro da cultivar Santa Clara, cultivadas em bandejas de isopor contendo o substrato Plantmax®, foram seccionadas na região do hipocótilo quando apresentavam o segundo par de

folhas definitivas. O sistema radicular foi descartado e o restante da planta imerso por seis horas, em suspensão de células de cada bactéria endofítica ajustada ao espectrofotômetro para $A_{540}=0,2$. Posteriormente, as seções de parte aérea foram plantadas em vasos de 3kg de capacidade contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1) previamente fumigada com brometo de metila, até o enraizamento.

Utilizou-se o mesmo procedimento para as plantas testemunhas, no entanto, a parte aérea foi imersa em água destilada esterilizada. As plantas permaneceram em casa de -vegetação até o término do experimento.

4.8 Seleção de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas e controlar a murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Cento e cinquenta isolados de bactérias endofíticas foram testados em quatro ensaios distintos, empregando-se 57 isolados no primeiro ensaio e 31 nos demais.

No primeiro ensaio, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 59 tratamentos, cinco repetições e duas plantas por parcela. Os tratamentos foram constituídos por 57 isolados endofíticos, uma testemunha tratada com água destilada esterilizada (testemunha absoluta) e uma testemunha inoculada com *R. solanacearum* (testemunha inoculada). No segundo, terceiro e quarto ensaios, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 33 tratamentos, cinco repetições e duas plantas por parcela. Os tratamentos foram constituídos por 31 isolados endofíticos, uma testemunha tratada com água destilada esterilizada (testemunha absoluta) e uma testemunha inoculada com *R. solanacearum* (testemunha inoculada).

Para avaliar a promoção de crescimento das plantas, mediu-se a altura do ponto de inserção das folhas cotiledonares até o ápice, dez dias após a

introdução das endofíticas e, em seguida, procedeu-se a infestação do solo com a bactéria desafiante.

A inoculação com *R. solanacearum* foi realizada pela irrigação do solo com 30mL de suspensão bacteriana na concentração $A_{540}=0,10$. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o término dos ensaios.

A severidade da murcha bacteriana foi avaliada aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação do patógeno. Para avaliar a severidade em todos os ensaios, foi utilizada a escala de Winstead & Kelman (1952) adaptada (Tabela 2). Após o término das avaliações, os dados de severidade foram integrados ao longo do tempo, obtendo-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela fórmula:

$$\text{AACPD} = \sum_{I=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i) \text{ (Shaner \& Finney, 1977)}$$

em que X é a intensidade da doença, t o tempo e n o número de avaliações no tempo.

Os dados de severidade e altura obtidos foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Scott-Knott.

4.9 Nova seleção entre os isolados de bactérias endofíticas com potencial para controlar a murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Os isolados de bactérias endofíticas que proporcionaram redução significativa da AACPD em relação à testemunha foram submetidos a nova seleção em um único ensaio. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 50 tratamentos, quatro repetições e duas plantas por parcela.

TABELA 2: Escala de avaliação para a murcha bacteriana do tomateiro (Winstead & Kelman, 1952)

Nota	Severidade
1	Ausência de sintomas
2	Até $\frac{1}{3}$ das folhas murchas
3	De $\frac{1}{3}$ até $\frac{2}{3}$ das folhas murchas
4	Toda a planta murcha, com exceção do broto terminal, que deve estar normal
5	Murcha total irreversível ou planta morta

Os tratamentos foram constituídos de 48 isolados, uma testemunha tratada com água destilada esterilizada (testemunha absoluta) e uma testemunha inoculada com *R. solanacearum* (testemunha inoculada).

A inoculação da bactéria desafiante e as avaliações da severidade da murcha bacteriana foram realizadas conforme descrito no item 4.7.

Os dados de severidade obtidos foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Scott-Knott.

4.10 Nova seleção entre os isolados de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas de tomateiro em casa de vegetação

Os isolados de bactérias endofíticas que proporcionaram aumento significativo da altura das plantas em relação à testemunha foram submetidos a nova seleção em um único ensaio. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 54 tratamentos, quatro repetições e duas plantas por parcela. Os tratamentos foram constituídos de 53 isolados e uma testemunha tratada com água destilada esterilizada (testemunha absoluta).

A avaliação da altura das plantas foi realizada conforme descrito no item 4.7.

Os dados de altura obtidos foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Scott-Knott.

4.11 Detecção de atividade *in vitro* dos isolados de bactérias endofíticas sobre *Ralstonia solanacearum*

Os isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados foram cultivados em meio 523 líquido por 24 horas a 28°C, transferidos para placas de Petri com meio 523 sólido em 4 pontos equidistantes e incubados por 48 horas a 28°C. Em seguida, as placas foram invertidas e, em cada tampa, adicionou-se 1ml de clorofórmio para matar as colônias. Após 30 minutos, as placas foram entreabertas e deixadas por mais 30 minutos para a completa evaporação do clorofórmio. A seguir, adicionou-se uma sobrecamada de 5ml de meio 523 semi-sólido fundente, contendo 100µl da suspensão de *R. solanacearum*. Foram preparadas cinco placas para cada isolado. Após a incubação a 28°C por 48 horas, as placas de Petri foram examinadas à procura de halos de inibição indicadores de antibiose (Romeiro, 2001).

4.12 Caracterização parcial dos isolados de bactérias endofíticas selecionados

Os isolados mais promissores na promoção de crescimento de plantas e no controle da murcha bacteriana do tomateiro foram caracterizados em relação à morfologia das colônias, coloração e bordos, reação de Gram, relação com o

oxigênio livre (O₂), produção de pigmento fluorescente e reação de hipersensibilidade (HR).

4.12.1 Reação de Gram

A reação de Gram foi realizada pelo método de coloração (Mariano, 2000). Os isolados de bactérias endofíticas foram cultivados em meio 523 e incubados por 24 horas a 28°C. Após a incubação, preparou-se um esfregaço a partir da suspensão bacteriana diluída em lâmina limpa. O esfregaço foi coberto com solução de cristal violeta por um minuto, sendo, em seguida, lavado rapidamente em água corrente. Cobriu-se, então, com lugol por um minuto, lavando-o novamente com água corrente. A seguir, fez-se a sua descoloração com álcool etílico por trinta segundos, contrastando-o em seguida com safranina por um minuto e lavando-o em água corrente. As lâminas foram secas ao ar e observadas com objetiva de imersão. As células foram consideradas gram positivas quando visualizadas com a coloração violeta e gram negativas, com coloração rosa.

4.12.2 Relação com o oxigênio livre

A determinação da relação com o oxigênio livre foi realizada pelo método da placa de Petri (Romeiro, 2001). Em placas contendo meio 523 solidificado, colocaram-se 100µL da suspensão bacteriana, os quais foram homogeneizados com uma alça de Drigalsky e cobertos cuidadosamente com uma lamínula esterilizada. Após a incubação a 28°C por 48 horas, as placas de Petri foram examinadas. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com o padrão de crescimento das bactérias endofíticas: a) aeróbica estrita: crescimento somente na superfície do meio, b) anaeróbica estrita: crescimento apenas em

baixo da lamínula e distante dos bordos e c) anaérobica facultativa: crescimento em toda a superfície do meio, inclusive em baixo da lamínula.

4.12.3 Pigmento fluorescente

A produção de pigmento fluorescente é característica em bactérias do gênero *Pseudomonas*, diferenciando o grupo fluorescente do não fluorescente. Para verificar a produção de pigmento fluorescente, os isolados de bactérias endofíticas foram repicados para tubos de ensaio contendo meio King B inclinado (Mariano, 2000) e incubados a 28°C por 48 horas. A seguir, as colônias foram examinadas sob luz ultravioleta a 365nm. Os isolados produtores de pigmento fluorescente deixam o meio com coloração esverdeada e fluorescente, caracterizando o resultado positivo para o teste. Utilizou-se como controle a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, produtora deste pigmento.

4.12.4 Reação de hipersensibilidade (HR)

Os isolados de bactérias endofíticas foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio 523 e incubados por 24 horas a 28°C. Após esse período, foi adicionada água de torneira até aproximadamente 1/3 da altura destes tubos e agitou-se vigorosamente. A concentração da suspensão bacteriana de cada isolado endofítico foi ajustada à 10^8 UFC/ml e infiltrada nos espaços intercelulares da face dorsal de folhas de fumo, entre as nervuras laterais, com uma seringa hipodérmica. Para a testemunha, empregou-se o mesmo procedimento, porém, a suspensão bacteriana foi substituída por água esterilizada. As plantas foram mantidas à temperatura ambiente e, entre 12 e 24 horas após a inoculação, foram observados ou não os sintomas típicos de HR, como a necrose e o dessecamento do tecido (Romeiro, 2001; Mariano, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Classificação do isolado de *R. solanacearum* em biovar

O isolado Rs-Cmd, utilizado neste trabalho, apresentou resultado positivo para todos os açúcares e negativo para todos os álcoois aos quais foi submetido (Tabela 3). Assim sendo, foi classificado como pertencente ao biovar II de *R. solanacearum*.

TABELA 3: Classificação do isolado de *Ralstonia solanacearum* em biovar

Isolado	Lactose	Maltose	Celobiose	Manitol	Dulcitol	Sorbitol
Rs-Cmd	+	+	+	-	-	-

+: Reação positiva; -: Reação negativa

Geralmente, os isolados de *R. solanacearum* são ativos sob altas temperaturas, com exceção do biovar II que ocorre em regiões de clima ameno, como a de Camanducaia, no Sul de Minas Gerais. De acordo com Reifschneider & Takatsu (1985), o biovar II é mais comum nas regiões sudeste, sul e centro-oeste, atacando, principalmente, plantas de batata.

Apesar do biovar II apresentar menor círculo de hospedeiros, sendo basicamente limitado à batata, também pode estar associado ao tomate e à berinjela (Hayward, 1991), concordando com os resultados obtidos neste trabalho e com o levantamento feito no estado do Amazonas por Boher et al. (1999), citados por Lima Neto (2001), que detectaram a presença do biovar II atacando a cultura do tomateiro.

5.2 Isolamento de bactérias endofíticas de plantas de tomateiros sadias

Foram obtidos 150 isolados de bactérias endofíticas de diferentes municípios no estado de Minas Gerais (Tabela 4), dos quais 40 foram provenientes de caules e folhas (UFV) e 110 de raízes (UFLA) de tomateiros sem sintomas de doenças.

Vários trabalhos têm demonstrado a ocorrência de bactérias endofíticas em diversos órgãos, tais como sementes e óvulos (Mundt & Hinkle, 1976), tubérculos (Tervet & Hollis, 1948), raízes (Philipson & Blair, 1957), hastes, folhas e frutos (Samish et al., 1961) de plantas de várias espécies.

O número de isolados endofíticos obtido a partir do sistema radicular foi maior do que o obtido a partir de folhas e caules, demonstrando que o emprego do ultra-som associado à desinfestação superficial tem sido feito com sucesso para o isolamento de bactérias endofíticas pelo método da trituração de tecidos (Mariano et al., 1997; Assis et al., 1998; Naves et al., 2004).

Independente da técnica utilizada no isolamento, encontram-se, na literatura, relatos de bactérias endofíticas isoladas de raízes de cenoura, beterraba, nabo, alfafa, arroz, milho, algodão e café (Hallmann et al., 1997; Sturtz et al., 2000). Essa observação vai ao encontro das afirmações de Mc Inroy & Kloepper (1995), Quadt-Hallmann & Kloepper (1996) e Lamb et al. (1996) de que há maior densidade populacional de endofíticas nas raízes e na parte inferior do caule, diminuindo em direção ao ápice da planta. Tal fato sugere o maior número de isolamentos desses organismos em raízes do que em folhas e caules.

5.3 Seleção de bactérias endofíticas com potencial para controlar a murcha bacteriana do tomateiro em condições de casa de vegetação

Na primeira seleção, realizada em quatro ensaios distintos, observou-se que 48 isolados proporcionaram redução significativa da severidade (AACPD)

TABELA 4: Isolados de bactérias endofíticas obtidos de plantas de tomateiros sadios provenientes de diferentes municípios no estado de Minas Gerais

Procedência	Número de isolados obtidos	Isolados
Lavras	25	UFLA 01-LS; UFLA 02-LS; UFLA 03-LS; UFLA 04-LS; UFLA 05-LS; UFLA 06-LS; UFLA 07-LS; UFLA 08-LS; UFLA 09-LS; UFLA 10-LS; UFLA 11-LS; UFLA 12-LS; UFLA 13-LS; UFLA 14-LS; UFLA 15-LS; UFLA 16-LS; UFLA 17-LS; UFLA 18-LS; UFLA 19-LS; UFLA 20-LS; UFLA 21-LS; UFLA 22-LS; UFLA 23-LS; UFLA 24-LS; UFLA 25-LS
Ijaci	22	UFLA 67-IJ; UFLA 68-IJ; UFLA 69-IJ; UFLA 70-IJ; UFLA 71-IJ; UFLA 72-IJ; UFLA 73-IJ; UFLA 74-IJ; UFLA 75-IJ; UFLA 76-IJ; UFLA 77-IJ; UFLA 78-IJ; UFLA 79-IJ; UFLA 80-IJ; UFLA 81-IJ; UFLA 82-IJ; UFLA 83-IJ; UFLA 84-IJ; UFLA 85-IJ; UFLA 86-IJ; UFLA 87-IJ; UFLA 88-IJ
Bom Sucesso	15	UFLA 89-BS; UFLA 90-BS; UFLA 91-BS; UFLA 92-BS; UFLA 93-BS; UFLA 94-BS; UFLA 95-BS; UFLA 96-BS; UFLA 97-BS; UFLA 98-BS; UFLA 99-BS; UFLA 100-BS; UFLA 101-BS; UFLA 102-BS; UFLA 103-BS
Ribeirão Vermelho	07	UFLA 104-RV; UFLA 105-RV; UFLA 106-RV; UFLA 107-RV; UFLA 108-RV; UFLA 109-RV; UFLA 110-RV
Nepomuceno	05	UFLA 62-NP; UFLA 63-NP; UFLA 64-NP; UFLA 65-NP; UFLA 66-NP
Três Pontas	36	UFLA 26-TP; UFLA 27-TP; UFLA 28-TP; UFLA 29-TP; UFLA 30-TP; UFLA 31-TP; UFLA 32-TP; UFLA 33-TP; UFLA 34-TP; UFLA 35-TP; UFLA 36-TP; UFLA 37-TP; UFLA 38-TP; UFLA 39-TP; UFLA 40-TP; UFLA 41-TP; UFLA 42-TP; UFLA 43-TP; UFLA 44-TP; UFLA 45-TP; UFLA 46-TP;

("...continua...")

“TABELA 4, Cont.”

		UFLA 44-TP; UFLA 45-TP; UFLA 46-TP; UFLA 47-TP; UFLA 48-TP; UFLA 49-TP; UFLA 50-TP; UFLA 51-TP; UFLA 52-TP; UFLA 53-TP; UFLA 54-TP; UFLA 55-TP; UFLA 56-TP; UFLA 57-TP; UFLA 58-TP
Viçosa	40	UFV-E02; UFV-E05; UFV-E06; UFV-E10; UFV-E13; UFV-E14; UFV-E15; UFV-E17; UFV-E18; UFV-E21; UFV-E22; UFV-E23; UFV-E24; UFV-E25; UFV-E26; UFV-E27; UFV-E28; UFV-E29; UFV-E30; UFV-E31; UFV-E32; UFV-E33; UFV-E34; UFV-E35; UFV-E37; UFV-E38; UFV-E39; UFV-E40; UFV-E41; UFV-E42; UFV-E43; UFV-E45; UFV-E48; UFV-E49; UFV-E51; UFV-E52; UFV-E53; UFV-E54; UFV-E56; UFV-E57
Total	150	

da murcha bacteriana do tomateiro em relação à testemunha inoculada com água. As plantas tratadas com os isolados UFV-E22, UFV-E29, UFV-E34, UFV-E57, UFLA 13-LS, UFLA 16-LS, UFLA 20-LS, UFLA 25-LS, UFLA 51-TP, UFLA 62-NP, UFLA 84-IJ E UFLA 103-BS não apresentaram sintomas da doença (Tabela 5).

Na segunda seleção, realizada em um único ensaio, 8 dos 48 isolados proporcionaram redução da severidade da doença em relação à testemunha (Tabela 6), mantendo o bom desempenho obtido na primeira seleção. Destes, os isolados UFV-E34 e UFLA 25-LS, responsáveis pelas menores áreas abaixo da curva de progresso da murcha bacteriana e pelas maiores porcentagens de controle da doença (31,25% e 21,52%, respectivamente) foram escolhidos para a continuação dos trabalhos.

Os actinomicetos (Moura et al., 1999) e as bactérias do rizopiano (Peixoto et al., 1995) têm sido empregados com sucesso no controle da murcha bacteriana do tomateiro. Trabalhos com bactérias endofíticas no controle desta

TABELA 5: Severidade da murcha bacteriana em tomateiros previamente tratados com diferentes isolados de bactérias endofíticas

Isolados	Severidade da murcha bacteriana (AACPD)			
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio
UFV-E02	43,75 a ¹	-	-	-
UFV-E17	39,90 a	-	-	-
UFV-E21	44,80 a	-	-	-
UFV-E22	25,00 a	-	-	-
UFV-E29	25,00 a	-	-	-
UFV-E31	46,20 a	-	-	-
UFV-E34	25,00 a	-	-	-
UFV-E36	36,40 a	-	-	-
UFV-E39	36,05 a	-	-	-
UFV-E43	37,10 a	-	-	-
UFV-E54	42,70 a	-	-	-
UFV-E57	25,00 a	-	-	-
UFLA 05-LS	-	35,70 a	-	-
UFLA 06 LS	-	37,80 a	-	-
UFLA 11-LS	-	39,90 a	-	-
UFLA 13-LS	-	25,00 a	-	-
UFLA 15-LS	-	44,80 a	-	-
UFLA 16-LS	-	25,00 a	-	-
UFLA 17-LS	-	44,10 a	-	-
UFLA 18-LS	-	47,60 a	-	-
UFLA 19-LS	-	55,30 a	-	-
UFLA 20-LS	-	25,00 a	-	-
UFLA 21-LS	-	35,35 a	-	-
UFLA 24-LS	-	59,05 a	-	-
UFLA 25-LS	-	25,00 a	-	-
UFLA 33-TP	-	58,10 a	-	-
UFLA 42-TP	-	-	49,35 a	-
UFLA 45-TP	-	-	39,90 a	-
UFLA 50-TP	-	-	57,70 a	-
UFLA 51-TP	-	-	25,00 a	-
UFLA 57-TP	-	-	36,05 a	-
UFLA 59-TP	-	-	53,20 a	-
UFLA 62-NP	-	-	25,00 a	-
UFLA 70-IJ	-	-	41,22 a	-
UFLA 71-IJ	-	-	61,60 a	-
UFLA 75-IJ	-	-	-	49,00 a
UFLA 76-IJ	-	-	-	46,55 a
UFLA 78-IJ	-	-	-	44,80 a

("...continua...")

“TABELA 5, Cont.”

UFLA 84-IJ	-	-	-	25,00 a
UFLA 89-BS	-	-	-	58,10 a
UFLA 91-BS	-	-	-	52,15 a
UFLA 96-BS	-	-	-	59,05 a
UFLA 99-BS	-	-	-	54,25 a
UFLA 101-BS	-	-	-	37,80 a
UFLA 102-BS	-	-	-	56,35 a
UFLA 103-BS	-	-	-	25,00 a
UFLA 107-RV	-	-	-	52,50 a
UFLA 108-RV	-	-	-	49,35 a
Testemunha	61,25 b	81,55 b	66,50 b	68,60 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

TABELA 6: Severidade da murcha bacteriana do tomateiro (AACPD) na segunda seleção dos isolados promissores de bactérias endofíticas

Isolados	AACPD	% de Controle	Halo de inibição
UFV-E34	86,63 a ¹	31,25	-
UFLA 25-LS	98,88 a	21,52	-
UFLA 91-BS	105,00 a	16,66	+
UFV-E54	105,00 a	16,66	-
UFLA 17-LS	105,88 a	15,97	-
UFLA 84-IJ	105,88 a	15,97	-
UFV-E17	106,31 a	15,63	+
UFLA 62-NP	112,44 a	10,76	-
Testemunha	126,00 b	0,00	-

(+): Presença de halo de inibição; (-): Ausência de halo de inibição

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

enfermidade também apresentam resultados promissores, apesar de serem mais recentes (Nascimento, 1998; Barretti, 2001).

Nascimento (1998) demonstrou que bactérias endofíticas obtidas de batata doce (BD6A10III3, BD6A1I2 e BD6A18VII3) e *Ipomea* sp. (I2A3II e I6A13IV2) reduziram a incidência da murcha bacteriana do tomateiro, apesar de

não diferirem da testemunha. No entanto, os isolados BD6A10III3 e BD6A1I2 foram responsáveis por reduções significativas na severidade da doença expressa pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (151,0 e 255,3), quando comparados às testemunhas (652,8 e 614,9) e aos demais tratamentos.

Em trabalhos anteriores, os isolados endofíticos UFV-E25 e UFV-E26 destacaram-se por reduzir a incidência da murcha bacteriana em 70% e 60%, respectivamente, diferindo da testemunha que apresentou 100% de murcha (Barretti, 2001). No entanto, estes isolados não mostraram o mesmo desempenho neste trabalho.

A aplicação da mistura de três bactérias endofíticas, *Bacillus* sp., *Serratia* sp. e *Pseudomonas* sp. resultou em redução de 63,4% a 78,5% na severidade da murcha bacteriana do tomateiro (Guo et al., 2004). De maneira semelhante, Nascimento (1998) obteve os menores valores de área abaixo da curva de progresso da murcha bacteriana (35,5 e 194,0) com a mistura de cinco bactérias endofíticas em comparação com a testemunha (652,8 e 614,9) e os demais isolados. Isso deve-se, provavelmente, à adição dos diferentes mecanismos de atuação de cada isolado (Raupach & Kloepper, 1998).

5.4 Seleção de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas de tomateiro em condições de casa de vegetação

Durante a seleção de bactérias endofíticas com potencial para controlar a murcha bacteriana, realizada em quatro ensaios distintos, observou-se que 53 isolados promoveram o crescimento do tomateiro em relação à testemunha inoculada com água (Tabela 7).

Quando estes isolados foram submetidos à nova seleção, realizada em um único ensaio, dez isolados proporcionaram aumento significativo da altura das plantas em relação à testemunha (Tabela 8). Destes, os isolados UFV-E17.

TABELA 7: Altura de plantas de tomateiro previamente tratadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas

Isolados	Altura (cm)			
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	4º Ensaio
UFV-E02	7,75 d ¹	-	-	-
UFV-E06	7,34 d	-	-	-
UFV-E10	6,99 d	-	-	-
UFV-E13	7,87 d	-	-	-
UFV-E14	7,33 d	-	-	-
UFV-E15	7,41 d	-	-	-
UFV-E17	8,57 c	-	-	-
UFV-E21	8,39 c	-	-	-
UFV-E22	8,45 c	-	-	-
UFV-E24	7,72 d	-	-	-
UFV-E25	10,55 a	-	-	-
UFV-E26	10,94 a	-	-	-
UFV-E27	8,79 c	-	-	-
UFV-E28	7,94 d	-	-	-
UFV-E29	8,99 c	-	-	-
UFV-E31	7,64 d	-	-	-
UFV-E33	6,96 d	-	-	-
UFV-E35	6,94 d	-	-	-
UFV-E37	6,14 e	-	-	-
UFV-E39	6,41 e	-	-	-
UFV-E40	6,15 e	-	-	-
UFV-E42	6,38 e	-	-	-
UFV-E45	9,23 c	-	-	-
UFV-E48	7,75 d	-	-	-
UFV-E49	11,07 a	-	-	-
UFV-E51	9,46 b	-	-	-
UFV-E53	6,26 e	-	-	-
UFV-E54	8,01 d	-	-	-
UFV-E57	6,99 d	-	-	-
UFLA 01-LS	-	7,24 c	-	-
UFLA 02-LS	-	8,53 b	-	-
UFLA 03-LS	-	7,8 c	-	-
UFLA 04-LS	-	8,89 b	-	-
UFLA 07-LS	-	11,64 a	-	-
UFLA 08-LS	-	7,84 c	-	-
UFLA 09-LS	-	8,37 b	-	-
UFLA 11-LS	-	8,13 b	-	-
UFLA 31-TP	-	7,66 c	-	-

(“...continua...”)

“TABELA 7, Cont.”

UFLA 48-TP	-	-	8.04 a	-
UFLA 51-TP	-	-	7.92 a	-
UFLA 54-TP	-	-	8.45 a	-
UFLA 55-TP	-	-	7.74 a	-
UFLA 56-TP	-	-	7.93 a	-
UFLA 57-TP	-	-	9.08 a	-
UFLA 67-IJ	-	-	7.81 a	-
UFLA 73-IJ	-	-	7.90 a	-
UFLA 81-IJ	-	-	-	7.82 a
UFLA 82-IJ	-	-	-	8.74 a
UFLA 83-IJ	-	-	-	7.98 a
UFLA 84-IJ	-	-	-	9.08 a
UFLA 87-IJ	-	-	-	8.02 a
UFLA 97-BS	-	-	-	8.12 a
UFLA 106-RV	-	-	-	7.92 a
Testemunha	6,07 f	6,41 d	7,69 b	7,20 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

TABELA 8: Altura de plantas de tomateiro tratadas com isolados de bactérias endofíticas na segunda seleção dos isolados promissores

Isolados	Altura (cm)	Inibição <i>in vitro</i> à <i>R. solanacearum</i>
UFV-E49	21,26 a ¹	-
UFV-E25	20,31 a	-
UFLA 08-LS	20,27 a	-
UFV-E27	18,71 a	-
UFV-E26	18,40 a	-
UFV-E29	18,38 a	-
UFV-E22	18,16 a	-
UFV-E17	17,95 a	+
UFLA 06-LS	17,24 a	+
UFLA 11-LS	17,17 a	-
Testemunha	16,11 b	-

(+): Presença de halo de inibição; (-): Ausência de halo de inibição

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

UFV-E22, UFLA 06-LS e UFLA 11-LS também reduziram a severidade da murcha bacteriana.

As bactérias endofíticas já foram associadas à promoção do crescimento de plantas em diversas culturas, incluindo tomate e alface (Bashan et al., 1989; van Peer & Schippers, 1989), batata (Frommel et al., 1991; Sturtz, 1995; van Peer & Schippers, 1989), milho (Hinton & Bacon, 1995; Lalande et al., 1989), pepino (van Peer & Schippers, 1989), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989).

Segundo Musson (1994), há relatos de que as bactérias endofíticas aumentam o crescimento das plantas e as protegem contra doenças, mas, segundo Oberhänsli et al. (1991), são raros os casos em que o mesmo isolado bacteriano apresenta, simultaneamente, características de controle e de promoção de crescimento.

Barretti (2001) verificou, em plantas de tomate tratadas com o isolado UFV-E13, pela técnica de Kijima et al. (1995), crescimento maior em relação às plantas não tratadas com o antagonista. É possível que o corte do hipocótilo, destituindo as plântulas de suas raízes, possa ativar mecanismos que auxiliam no crescimento das plantas, concordando com Kijima et al. (1995) que observaram maior crescimento de várias plantas, comparadas àquelas com suas raízes conservadas.

Vários mecanismos estão envolvidos na promoção de crescimento das plantas por bactérias endofíticas. Estes, porém, podem ser divididos em mecanismos diretos e indiretos. Quando o estímulo do crescimento das plantas é direto, o antagonista produz fitormônios ou substâncias análogas destes reguladores de crescimento capazes de estimular o desenvolvimento da planta (Bashan & Holguin, 1997) ou, então, a endofítica aumenta a absorção de nutrientes minerais e água (Hallmann et al., 1997; Lazarovits & Nowak, 1997). Quando o efeito é indireto, o crescimento é estimulado pela redução da

população de microrganismos deletérios ou patogênicos às plantas, ou seja, pelo controle biológico de fitopatógenos (Hallmann et al., 1997).

Shishido et al. (1995) verificaram que isolados endofíticos de *Bacillus* sp. e *Streptomyces* sp. estimularam o crescimento de mudas de coníferas, pois foram capazes de controlar os organismos responsáveis pela inibição do crescimento destas plantas.

5.5 Detecção de atividade *in vitro* dos isolados de bactérias endofíticas sobre *Ralstonia solanacearum*

Dos doze isolados submetidos ao teste para detecção de antibiose, verificou-se que os isolados UFV-E17, UFLA 06-LS e UFLA 91-BS apresentaram efeito inibidor direto sobre o patógeno estudado (Tabelas 6 e 8).

O modo de ação dos isolados UFV-E34 e UFLA 25-LS, selecionados como possíveis agentes de biocontrole, sugere a resistência induzida como mecanismo envolvido na redução da severidade da murcha bacteriana do tomateiro, isto porque alguns critérios formulados por Steiner & Schönbeck (1995) para distinguir a resistência induzida de outros mecanismos foram atendidos. Os isolados selecionados não tiveram efeitos tóxicos *in vitro* sobre *R. solanacearum*, além de haver a necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e o início de proteção na planta.

5.6 Caracterização morfológica e fisiológica dos isolados de bactérias endofíticas

As características morfológicas dos doze isolados selecionados, dez para a promoção de crescimento de plantas e dois para o controle da murcha bacteriana do tomateiro, apresentaram predominância de colônias de coloração creme e aspecto brilhante, forma circular e superfície e bordos lisos (Tabela 9).

TABELA 9: Características morfológicas das colônias de bactérias endofíticas previamente selecionadas para promover crescimento e controlar a murcha bacteriana do tomateiro

Isolados	Características morfológicas das colônias			
	cor	forma	superfície	bordo
UFV-E17	creme (brilhante)	circular	lisa	liso
UFV-E22	creme (opaca)	irregular	rugosa	ondulado
UFV-E25	creme (brilhante)	irregular	lisa	filamentoso
UFV-E26	creme (brilhante)	circular	lisa	liso
UFV-E27	branca a creme (brilhante)	irregular	lisa	ondulado
UFV-E29	branca (brilhante)	irregular	rugosa	ondulado
UFV-E34	amarelada (brilhante)	circular	lisa	ondulado
UFV-E49	creme (brilhante)	circular	lisa	liso
UFLA 06-LS	creme a amarelada (brilhante)	circular	lisa	liso
UFLA 08-LS	amarelada (brilhante)	irregular	lisa	ondulado
UFLA 11-LS	amarela (opaca)	circular	lisa	liso
UFLA 25-LS	creme (brilhante)	circular	lisa	liso

Dos isolados selecionados, sete são gram positivos (UFV-E22, UFV-E26, UFV-E29, UFV-E34, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS, UFLA 11-LS) e cinco gram negativos (UFV-E17, UFV-E25, UFV-E27, UFV-E49, UFLA 25-LS) (Tabela 10).

Na relação com o oxigênio livre, apenas o isolado UFV-E25 comportou-se como anaeróbio facultativo e os demais como aeróbios estritos (Tabela 10). Dentre os isolados gram negativos, nenhum produziu pigmentos fluorescentes em meio King B, não sendo indicativo de *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 10).

Quanto à reação de hipersensibilidade, nenhum dos isolados selecionados induziu HR em plantas de fumo, indicando ausência de fitopatogenicidade (Tabela 10).

As bactérias isoladas de tecidos internos de plantas sadias compreendem aproximadamente 129 espécies, representando cerca de 54 gêneros (Mundt & Hinkle, 1976; Gardner et al., 1982; McInroy & Klopper, 1995; Sturtz, 1995).

TABELA 10: Características fisiológicas e patogênicas dos isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados como promotores do crescimento e controle da murcha bacteriana do tomateiro

Isolados	Gram	Oxigênio livre	Fluorescência	HR
UFV-E17	-	aeróbio estrito	-	-
UFV-E22	+	aeróbio estrito	-	-
UFV-E25	-	anaeróbio facultativo	-	-
UFV-E26	+	aeróbio estrito	-	-
UFV-E27	-	aeróbio estrito	-	-
UFV-E29	+	aeróbio estrito	-	-
UFV-E34	+	aeróbio estrito	-	-
UFV-E49	-	aeróbio estrito	-	-
UFLA 06-LS	+	aeróbio estrito	-	-
UFLA 08-LS	+	aeróbio estrito	-	-
UFLA 11-LS	+	aeróbio estrito	-	-
UFLA 25-LS	-	aeróbio estrito	-	-

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo

De acordo com Hallmann et al. (1997), predominam os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Agrobacterium*.

Ishida (2004), ao fazer a caracterização parcial de quatro isolados previamente selecionados para o controle da mancha angular do algodoeiro, verificou que três deles eram gram positivos. Quanto à relação com oxigênio, dois comportaram-se como aeróbios estritos e dois como anaeróbios facultativos.

De forma semelhante, Silva (2004) constatou que, dos 53 isolados de bactérias endofíticas provenientes de hastes e folhas de tomate e pimentão, cerca de 73,07% foram gram positivos, 84,61% cresceram na ausência de oxigênio e nenhum isolado produziu pigmentos fluorescentes. Por outro lado, Naves et al. (2002) verificaram que em 81 isolados endofíticos obtidos do sistema radicular de diferentes plantas amostradas, 59,56% foram gram negativos e 40,74% gram positivos. Dentre os isolados gram negativos, 37,50% produziram pigmentos fluorescentes em meio King B.

6 CONCLUSÕES

- 1 Foram obtidos 150 isolados de bactérias endofíticas, sendo 40 a partir de folhas e caules e 110 de raízes de tomateiro. Deste total, dez promoveram o crescimento e oito reduziram a severidade da murcha bacteriana do tomateiro em relação à testemunha.
- 2 Apenas quatro isolados promoveram o crescimento de plantas e controlaram a murcha bacteriana do tomateiro.
- 3 Os isolados UFV-E34 e UFLA 25-LS, selecionados para o controle da murcha bacteriana do tomateiro, não apresentaram efeito inibidor direto sobre *R. solanacearum*, indicando a indução de resistência como provável mecanismo de controle da doença.
- 4 Dos dez isolados selecionados como promotores de crescimento de plantas de tomateiro, somente UFV-E17 e UFLA 06-LS inibiram *in vitro* o crescimento de *R. solanacearum*.
- 5 Dentre os isolados endofíticos testados, predominaram as do tipo gram positivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, S.M.P. et al. Bactérias endofíticas - método de isolamento e potencial antagonico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, p.216-220, 1998.
- BARRETTI, P.B. **Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencialidade para o biocontrole de enfermidades do tomateiro**. 2001. 38p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- BASHAN, Y. et al. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p.1317-1324, 1989.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.
- BROOKS, D.S. et al. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, San Diego, v.4, p.373-381, 1994.
- CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v.5, p.83-91, 1995.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows Versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. Programa e Resumos... São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.
- FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, p.928-936, 1991.
- GARDNER, J.M.; FELDMAN, A.W.; ZABLOTOWSCZ, R.M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon root of Florida citrus trees. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.1335-1342, 1982.



GUO, J.H. et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, San Diego, v.29, p.66-72, 2004.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.

HAYWARD, A.C. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.27, p.265-277, 1964.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.65-87, 1991.

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

HOLLIS, J.P. Bacteria in healthy potato tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v.41, p.350-367, 1951.


HUREK, T. et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 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 em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

KIJIMA, T. et al. Process for biologically preventing dicotyledoneous plant diseases using symbiotical bacteria. USA Patent. No. 5.401.655 (03-28-1995). 1995. 12p.

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



LALANDE, R. et al. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant growth-promoting potencial. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, p.7-11, 1989.

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

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, Alexandria, v.32, p. 188-192, 1997.

LIMA NETO, A.F. **Herança da resistência de genótipos de tomateiro a *Ralstonia solanacearum*, agente da murcha bacteriana do tomateiro**. 2001. 90p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: [s.n.], 2000. 171p.

MARIANO, R.L.R. et al. Método de isolamento de bactérias endofíticas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.235, 1997. (Suplemento).

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

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S.; NEVES, M.C.P. Bioensaio para avaliação em massa de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.2065-2072, 1999.

MUKHOPADHYAY, N.K. et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v.134, p.151-159, 1996.

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

MUSSON, G. **Ecology and effects of endophytic bacteria in plants**. 1994. 68p. Thesis (Master thesis)-Auburn University, Auburn, Ala.

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

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.384-388, 2004.

OBERHÄNSLI, T.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Indolo-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2273-2279, 1991.

PEIXOTO, A.R. et al. Ação antagonística de *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.21, p.219-224, 1995.

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

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

POON, E.S.; HUANG, T.C.; KUO, T.T. Possible mechanism of symptom inhibition of bacterial blight of rice by an endophytic bacterium isolated from rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.18, p.61-70, 1977.

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, p.1144-1154, 1996.

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

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil - aspectos epidemiológicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.213, 1985.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279p.

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

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.1183-1186, 1977.

SHISHIDO, M.; LOEB, B.M. ; CHANWAY, C.P. External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.707-713, 1995.

SILVA, J.R.C. **Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta bacterianas do tomateiro**. 2004. 160p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monoct. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Ed.). **Induced resistance to disease in plants: developments in plant pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.86-110.

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

STURTZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

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

TERVET, I.W.; HOLLIS J.P. Bacteria in storage organs healthy plants. **Phytopathology**, Madison, v.38, p.157-165, 1948.

THOMAS, W.D.; GRAHAM, R.W. Bacteria in apparently healthy pinto beans. **Phytopathology**, Madison, v.42, p.214, 1952.

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.

van PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.456-463, 1989.

WINSTEAD, N.N; KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Madison, v.42, p.628-634, 1952.

CAPÍTULO 3

ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E GENÓTIPOS RESISTENTES VISANDO AO CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

1 RESUMO

BARRETTI, Patrícia Baston. Associação de bactérias endofíticas e genótipos resistentes visando ao controle da murcha bacteriana do tomateiro. In: _____. **Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por associação: endofítia, resistência induzida e varietal.** 2005. Cap.3, p.70-88. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - UFLA, Lavras, MG.*

A partir de 150 isolados de bactérias endofíticas obtidos de folhas, caules e raízes de plantas de tomateiros, foram selecionados dois isolados (UFV-E34 e UFLA 25-LS) com potencial para reduzir a severidade da murcha bacteriana. Visando obter técnicas alternativas ao manejo da doença, esses isolados foram introduzidos em plântulas das cultivares Caraíbe, Drica, Santa Clara e do genótipo Yoshimatsu com diferentes níveis de resistência à doença. Para a introdução dos antagonistas selecionados utilizou-se o corte do hipocótilo. Dez dias após o transplante das seções de parte aérea, procedeu-se a infestação do solo com a bactéria desafiante, em casa de vegetação. A severidade da murcha bacteriana foi avaliada a cada cinco dias durante um mês e, após a sexta avaliação, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Três métodos de introdução das bactérias endofíticas foram testados: microbiolização de sementes, irrigação do substrato e corte do hipocótilo. A combinação entre genótipos resistentes e endofíticas reduziu a severidade da doença entre 20,52% e 64,85% em relação às respectivas testemunhas. O isolado UFV-E34 foi mais eficaz do que UFLA 25-LS na associação com as cultivares, com exceção da cv. Caraíbe, que não apresentou diferença significativa entre os isolados. Os métodos de introdução de bactérias endofíticas avaliados não diferiram entre si.

*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV e Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

BARRETTI, Patrícia Baston. Association between endophytic bacteria and resistant genotypes aiming at the control of tomato bacterial wilt. In: _____. **Tomato bacterial wilt and possibilities of its control through the association of endophytic bacteria and induced and variety resistance.** 2005. Chap.3, p.70-88. Thesis (Doctorate in Phytopathology) - UFLA, Lavras, MG.*

Out of 150 isolates of endophytic bacteria obtained from leaves, stems and roots of tomatoes plants, two were selected (UFV-E34 and UFLA 25-LS) with potential to reduce *in vivo* tomato bacterial wilt severity. To obtain alternative techniques to control bacterial wilt, the isolates were applied in tomato seedlings cv. Caraíbe, Drica, Santa Clara and in genotype Yoshimatsu with different disease resistance levels. To apply the selected antagonists was used a cut in the hypocotyl. The pathogenic bacteria was inoculated ten days after transplanting the upper portion of the cut seedlings by soil drenching with a cell suspension. Bacterial wilt severity was assessed every five days, during one month. The area under disease progress curve (AUDPC) was calculated after the sixth assessment. Three methods to apply endophytic bacteria were tested: seeds microbiolization, irrigation substrate and cut of the hypocotyl. The combination of resistant genotypes and endophytic bacteria reduced disease severity in a range of 20.52% and 64.85% in relation to the respective untreated plants. The isolate UFV-E34 was more efficient than UFLA 25-LS in the association with the cultivars, except for cv. Caraíbe in which no significant difference among the isolates was observed. The methods to apply endophytic bacteria did not affect the efficiency of the isolates in controlling the disease.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Avdiser), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV and Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana é considerada uma das mais importantes doenças de plantas, sendo amplamente distribuída pelo mundo, altamente destrutiva e capaz de infectar várias espécies (Kelman & Jensen, 1951; Hayward, 1994). Dentre as famílias vegetais de importância econômica atacadas pela doença, as solanáceas são as mais severamente afetadas (Lopes & Reifschneider, 1999).

Geralmente, as maiores incidências da doença ocorrem em regiões de alta temperatura e umidade do solo (Hayward, 1991; Kelman et al., 1994; Takatsu & Lopes, 1997), tornando-se fatores limitantes à tomaticultura.

O controle da murcha é difícil devido à sobrevivência do patógeno no solo, à ampla gama de hospedeiros e à variabilidade da bactéria, principalmente sob condições ambiente favoráveis à doença (Takatsu & Lopes, 1997). As medidas a serem adotadas dependem da cultura, dos isolados do patógeno presentes, do conhecimento do seu sítio de sobrevivência e do modo de transmissão (Hayward, 1994). Dentre essas estratégias, incluem-se a seleção de material de plantio livre do patógeno, a rotação de culturas, a eliminação de plantas invasoras suscetíveis e o uso de microrganismos antagonistas e de cultivares resistentes (Michel et al., 1996).

O controle efetivo da murcha tem sido obtido por meio do melhoramento genético. No entanto, o conhecimento do biovar de *R. solanacearum* em determinada área é extremamente importante para o desenvolvimento de cultivares resistentes, pois as variedades desenvolvidas com alto nível de resistência para um determinado local podem não se desenvolver bem em outras condições ambiente ou a outros isolados do patógeno (Kelman et al., 1994).

Os actinomicetos (Moura et al., 1999) e as bactérias do rizoplane (Peixoto et al., 1995) têm sido pesquisados com sucesso no controle da murcha bacteriana do tomateiro.

Nascimento (1998) verificou que bactérias endofíticas obtidas de batata doce e *Ipomea* sp. promoveram reduções na incidência e na severidade da murcha bacteriana do tomateiro. De maneira semelhante, dois isolados endofíticos provenientes de tomateiros também destacaram-se por reduzir a incidência desta doença, diferindo da testemunha não tratada que apresentou 100% de murcha (Barretti, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito em conjunto de bactérias endofíticas e genótipos de tomateiro com diferentes níveis de resistência no controle da murcha bacteriana, bem como diferentes métodos de introdução das bactérias endofíticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação dos experimentos

Os experimentos foram instalados e conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

4.2 Origem e preservação do patógeno

O isolado de *R. solanacearum* biovar II, proveniente da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da UFLA, foi preservado em peptona-glicerol a -80°C . Para realizar os testes, foi transferido para o meio 523 de Kado & Heskett (1970), pelo método de estrias paralelas e incubado a 28°C por 48 horas. Em seguida, foi submetido ao teste de patogenicidade. Vinte e um dias após a semeadura, em casa de vegetação, plântulas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram inoculadas pelo método de imersão das raízes das plântulas na suspensão bacteriana (Winstead & Kelman, 1952) e, posteriormente, transplantadas para vasos com capacidade de 1,5kg contendo solo.

As plantas com sintoma de murcha foram submetidas ao “teste do copo”. Observada a exsudação, cortaram-se as hastes das plantas em pequenas seções, as quais foram desinfestadas superficialmente em álcool etílico (70%) por trinta segundos e em hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto e lavadas em água destilada esterilizada. A seguir, as seções foram colocadas perpendicularmente em placas de Petri, com a extremidade imersa em água destilada esterilizada para que ocorresse a exsudação. Após 10 minutos, observada a exsudação bacteriana, fez-se a repicagem, pelo método de estrias paralelas, em placas de

Petri contendo meio de cultura 523. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

A identificação do isolado em nível de biovar foi feita por meio dos testes de produção de açúcares (maltose, lactose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), segundo a metodologia de Hayward (1964) (Capítulo 2).

4.3 Origem, isolamento e preservação dos isolados de bactérias endofíticas

Os isolados de bactérias endofíticas UFV-E34 e UFLA 25-LS, previamente selecionados (Capítulo 2), obtidos de plantas de tomateiro provenientes das regiões de Viçosa e Lavras, Minas Gerais, foram preservados em peptona-glicerol a -80°C. Para realizar os testes, os isolados endofíticos foram transferidas para placas de Petri contendo meio 523 e incubadas a 28°C em câmara de crescimento. Após 48 horas, foram preparadas as suspensões bacterianas adicionando-se água de torneira e homogeneizando-se com a alça de Drigalsky.

4.4 Associação entre bactérias endofíticas e genótipos de tomateiros com diferentes níveis de resistência a *R. solanacearum* no controle da murcha bacteriana em casa de vegetação

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com oito tratamentos, quatro repetições e duas plantas por parcela, obedecendo ao arranjo fatorial 4 x 2 com quatro genótipos de tomateiro (Caraíbe, Drica, Santa Clara e Yoshimatsu) e dois isolados de bactérias endofíticas (UFV-E34 e UFLA 25-LS) com quatro tratamentos adicionais. Os tratamentos adicionais constituíram-se de plantas de cada genótipo inoculadas com *R. solanacearum* (testemunhas inoculadas).

A introdução das bactérias endofíticas em plântulas de tomateiro nos genótipos Caraíbe, Drica, Santa Clara e Yoshimatsu, cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax®, foi feita pelo corte do hipocótilo (Kijima et al., 1995) como se segue. Plântulas de tomateiro apresentando segundo par de folhas definitivas foram seccionadas na região do hipocótilo. O sistema radicular foi descartado e o restante da planta imerso por seis horas, em suspensão de células de cada bactéria endofítica ajustada ao espectrofotômetro para $A_{540}=0,2$. Posteriormente, as seções de parte aérea foram plantadas em vasos de 5kg de capacidade contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1) previamente fumigada com brometo de metila, aguardando-se o enraizamento.

Para as plantas testemunha utilizou-se o mesmo procedimento, no entanto, a parte aérea foi imersa em água destilada esterilizada.

A inoculação com *R. solanacearum* foi realizada pela irrigação do solo com 30mL de suspensão bacteriana na concentração $A_{540}=0,10$. As plantas permaneceram em casa de vegetação até o término do experimento.

A severidade da murcha bacteriana foi avaliada aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação do patógeno, empregando-se a escala de Winstead & Kelman (1952) adaptada (Capítulo 2). Após o término das avaliações, os dados de severidade foram integrados ao longo do tempo, obtendo-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela fórmula proposta por Shaner & Finney (1977) (Capítulo 2).

Os dados de severidade da murcha bacteriana foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Scott-Knott.

4.5 Comparação entre métodos de introdução de bactérias endofíticas para o controle da murcha bacteriana do tomateiro

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com seis tratamentos, quatro repetições e duas plantas por parcela, obedecendo ao arranjo fatorial 3 x 2 com três métodos de introdução das bactérias endofíticas (microbiolização de sementes, irrigação do substrato e corte do hipocótilo) e dois isolados de bactérias endofíticas (UFV-E34 e UFLA 25-LS) com um tratamento adicional. O tratamento adicional constituiu-se da testemunha inoculada com *R. solanacearum*.

A inoculação da bactéria desafiante e as avaliações da severidade da murcha bacteriana foram realizadas conforme descrito no item 4.4. As plantas permaneceram em casa de vegetação até o término do experimento.

Os dados de severidade da murcha bacteriana foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Scott-Knott.

4.5.1 Introdução de bactérias endofíticas por microbiolização de sementes

As sementes de tomateiro da cultivar Santa Clara foram desinfestadas superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e, em seguida, enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Após secagem em papel filtro, as sementes foram imersas por 30 minutos em suspensão de células de cada bactéria endofítica ajustada ao espectrofotômetro para $A_{540}=0,2$. Em seguida, foram semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células contendo substrato Plantmax®. Foram colocadas quatro sementes por célula, sendo feito o desbaste sete dias após a semeadura, deixando-se uma plântula por célula.

Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para vasos de 3kg de capacidade contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1), previamente fumigada com brometo de metila.

Para as plantas testemunha, utilizou-se o mesmo procedimento, no entanto, as sementes foram imersas em água destilada esterilizada.

4.5.2 Introdução de bactérias endofíticas por irrigação do substrato

A irrigação do substrato na bandeja foi feita pela distribuição de 10mL de suspensão de células de cada bactéria endofítica ajustada ao espectrofotômetro para $A_{540}=0,2$ por célula. Após a homogeneização do substrato, quatro sementes de tomateiro da cultivar Santa Clara desinfestadas superficialmente, conforme descrito no item 4.5.1, foram semeadas por célula, sendo feito o desbaste sete dias após a semeadura, deixando-se uma plântula por célula. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para vasos de 3kg de capacidade contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1), previamente fumigada com brometo de metila.

Para as plantas testemunha, utilizou-se o mesmo procedimento, no entanto, o substrato foi irrigado com água destilada esterilizada.

4.5.3 Introdução de bactérias endofíticas pelo corte do hipocótilo

O preparo das mudas de tomateiro da cultivar Santa Clara e a introdução dos isolados endofíticos ocorreu conforme descrito no item 4.4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Associação entre bactérias endofíticas e genótipos de tomateiros com diferentes níveis de resistência a *R. solanacearum* no controle da murcha bacteriana em casa de vegetação

Houve interação entre os diferentes genótipos de tomateiro e os isolados endofíticos (Tabela 1). Dessa forma, verificou-se que a introdução dos isolados UFV-E34 e UFLA 25-LS nas cultivares Caraíbe e Santa Clara e no genótipo Yoshimatsu e UFV-E34 na cv. Drica proporcionou reduções variáveis na severidade (AACPD) da murcha bacteriana, com a porcentagem de controle da doença variando entre 15,6% e 64,9% em relação às respectivas testemunhas. No entanto, o mesmo efeito sinérgico não foi observado quando a cv. Drica foi tratada com UFLA 25-LS (Tabela 1).

O isolado UFV-E34 foi mais eficiente na redução da AACPD, exceto para a cv. Caraíbe, para a qual não houve diferença entre os isolados (Tabela 1). Este resultado vem ao encontro dos obtidos no capítulo 2 que, apesar de UFV-E34 não diferir estatisticamente de UFLA 25-LS, apresentou a maior porcentagem de controle (31,25%) da murcha bacteriana em relação à testemunha.

Diversos genótipos têm demonstrado resistência à murcha bacteriana. No entanto, as cultivares Caraíbe, Drica e o genótipo Yoshimatsu têm sido utilizados como padrão de resistência, enquanto a cv. Santa Clara e o genótipo L-390 têm sido utilizados como padrão de suscetibilidade (Lopes et al., 1994).

Experimentos realizados em casa de vegetação, no município de Lavras, MG, mostraram que as cultivares Caraíbe e Drica apresentaram menor AACPD em relação à cv. Santa Clara. Em solo naturalmente infestado, no município de Palmas, TO, a cv. Santa Clara também apresentou a maior AACPD (118,56) diferindo das cultivares Drica e Caraíbe (66,40 e 66,96) (Lima Neto, 2001).

TABELA 1: Severidade da murcha bacteriana do tomateiro em genótipos resistentes tratados com bactérias endofíticas previamente selecionadas

Trat.	Caraíbe		Drica		Santa Clara		Yoshimatsu	
	sev ³	% ⁴	sev ³	% ⁴	sev ³	% ⁴	sev ³	% ⁴
UFV34	68,6 a ¹ B ²	20,5	67,5 aB	15,6	75,4 aC	34,5	33,4 aA	64,9
UFLA25	67,5 aB	21,7	83,8 cC	-	89,8 bD	21,9	37,5 bA	60,5
Test.	86,3 bB	-	80,0 bA	-	115,0 cD	-	95,0 cC	-

¹Médias seguidas pela mesma letra (minúscula), na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula), na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

³Severidade da murcha bacteriana do tomateiro (AACPD)

⁴Porcentagem de controle em relação às respectivas testemunhas

Resultados semelhantes foram obtidos por Reis (1996) que, ao avaliar a resistência de diferentes linhagens e cultivares, constatou superioridade da cv. Hawaii 7998 (grupo 1 de controle), seguida da 'Caraíbe' e do genótipo Yoshimatsu (grupo 2 de controle) em relação às testemunhas 'Santa Clara' e 'Ângela' (grupo 8 de controle). Por outro lado, observou-se neste trabalho que a introdução das bactérias endofíticas em plantas da cv. Santa Clara também reduziu a severidade da doença quando comparada à testemunha não tratada, indicando que esta interação pode melhorar a resistência dos genótipos suscetíveis.

Os programas de melhoramento do tomateiro para resistência à murcha bacteriana têm encontrado dificuldades em obter materiais com resistência estável à doença, uma vez que o desenvolvimento de cultivares resistentes é dependente das condições de ambiente e do biovar de *R. solanacearum* (Hayward, 1994) Assim, alguns genótipos desenvolvidos para um determinado local podem falhar quando plantados em outras regiões, nas quais predominam

condições ambientes favoráveis à doença e outras variantes do patógeno (Kelman et al., 1994). De acordo com McCarter (1991), em diferentes partes do mundo, genótipos de tomateiro tidos como resistentes à murcha bacteriana têm se comportado como suscetíveis quando submetidos a diferentes isolados.

Chumvissot & Lambeth (1983) testaram, em casa de vegetação e campo, genótipos oriundos de vários países a diferentes isolados de *R. solanacearum* e observaram que, devido à ocorrência de altas temperaturas durante a condução dos ensaios, somente dois genótipos, CRA 66 e VC 48-1 foram resistentes. Todos os demais, incluindo a recém-lançada variedade Vênus, foram suscetíveis. Resultados semelhantes foram observados por Lopes et al. (1994) para os genótipos Rotam-4, Yoshimatsu 4-11, Hawaii 7998, Irat 3, Rodasse e a cv. Carafbe, que apresentaram altos índices de doença ao biovar I de *R. solanacearum*, apesar de serem tidos como resistentes.

Um outro obstáculo relatado por pesquisadores para se obter material genético de tomate resistente à murcha bacteriana é a dificuldade em combinar níveis satisfatórios de resistência com tamanho e qualidade dos frutos (Reis, 1996). Evidências indicam que há uma forte ligação entre os genes que controlam a resistência hospedeira em tomateiro e os genes responsáveis pelo pequeno tamanho do fruto (Sonoda & Augustine, 1978).

5.2 Comparação entre métodos de introdução de bactérias endofíticas para o controle da murcha bacteriana do tomateiro

Não houve interação entre os isolados e os métodos de introdução. Dessa forma, foi realizada a análise individual dos fatores.

Os três métodos utilizados diferiram entre si quanto à redução da severidade da murcha bacteriana do tomateiro (Tabela 2).

TABELA 2: Severidade da murcha bacteriana (AACPD) em tomateiros tratados por diferentes métodos com bactérias endofíticas

Métodos de introdução	AACPD	% de controle ²
Microbiolização de sementes	34,69 a ¹	55,95
Irrigação do substrato	43,44 a	44,84
Corte do hipocótilo	50,63 a	35,71
Testemunha inoculada	78,75 b	-

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²Em relação à testemunha

As plantas tratadas por microbiolização de sementes reduziram em 55,95% a severidade da doença, enquanto que em plantas tratadas pelo método de irrigação do substrato e pelo corte do hipocótilo a redução da doença foi de 44,84% e 35,71%, respectivamente, em relação à testemunha.

Os isolados UFV-E34 e UFLA 25-LS não diferiram significativamente entre si, mas diferiram da testemunha, proporcionando AACPD menores do que a testemunha (Tabela 3).

Estudos comparando diferentes métodos de introdução indicaram que a aplicação de bactérias endofíticas para introdução no tecido da planta é específico para cada isolado (Musson et al., 1995). Porém, a eficiência dos três métodos avaliados neste trabalho mostraram que, uma vez dentro das plantas, sob condições de disponibilidade de nutrientes e de pouca ou até mesmo nenhuma competição microbiana, as endofíticas são capazes de se multiplicar e colonizar os tecidos da hospedeira e adaptadas ao hábitat, podem atuar como agentes de controle biológico de diversos patógenos.

Os métodos de introdução de bactérias endofíticas avaliados neste trabalho têm sido amplamente utilizados, por diversos autores, pelas vantagens que oferecem em relação aos outros (Nascimento, 1998; Naves, 2000; Barretti, 2001; Silva, 2004). De acordo com Kijima et al. (1995), é possível que o corte do hipocótilo, destituindo as plântulas de suas raízes, possa ativar mecanismos

TABELA 3: Severidade da murcha bacteriana do tomateiro (AACPD) proveniente de isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados

Isolado	AACPD	% de controle ²
UFV-E34	41,67 a ¹	47,09
UFLA 25-LS	50,83 a	34,45
Testemunha inoculada	78,75 b	-

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²Em relação à testemunha

que confirmam proteção contra patógenos, induzindo certa resistência às plantas. No entanto, a microbiolização de sementes e a irrigação do substrato oferecem proteção às plântulas desde o início da germinação da semente e podem ser aplicadas em conjunto, aumentando assim a proteção conferida às plantas (Naves, 2000).

Os métodos testados neste trabalho são rápidos e práticos, podendo ser utilizados na produção de mudas em larga escala. No entanto, as sementes microbiolizadas podem ser armazenadas por diversos meses (Hallmann et al., 1997).

6 CONCLUSÕES

- 1 A associação entre bactérias endofíticas e genótipos de tomateiros com diferentes níveis de resistência a *R. solanacearum* reduziu a severidade da murcha bacteriana entre 15,6% e 64,9%.
- 2 O isolado UFV-E34 foi mais eficaz do que UFLA 25-LS na associação com as cultivares, com exceção da cv. Caraibe, que não apresentou diferença significativa entre os isolados.
- 3 Os métodos de introdução de bactérias endofíticas testados, microbiolização de sementes, irrigação do substrato e corte do hipocótilo, não diferiram estatisticamente na eficiência em reduzir a severidade da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHUMVISSOT, C.; LAMBETH, V. Bacterial wilt resistance in exotic tomato germplasm. *HortScience*, Alexandria, v.18, p.50-51, 1983.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows Versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.

HAYWARD, A.C. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, London, v.27, p.265-277, 1964.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.29, p.65-87, 1991.

HAYWARD, A.C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*.** Wallingford: CAB International, 1994. p.9-24.

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

KELMAN, A.; HARTMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*.** Wallingford: CAB International, 1994. 259p.

KELMAN, A.; JENSEN, J.H. Maitainig virulence in isolates of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, Madison, v.41, p.185-187, 1951.

KIJIMA, T. et al. **Process for biologically preventing dicotyledoneous plant diseases using symbiotical bacteria.** USA Patent. No. 5.401.655 (03-28-1995). 1995. 12p.

LIMA NETO, A. F. **Herança da resistência de genótipos de tomateiro a *Ralstonia solanacearum*, agente da murcha bacteriana do tomateiro.** 2001. 90p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.98, p.1091-1094, 1994.

LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, p.56-60, 1999.

MCCARTER, S.M. Bacterial wilt. In: JONES, J.B. et al. (Ed.) **Compendium of tomato diseases.** New York: The American Phytopathological Society, 1991. p.28-29.

MICHEL, V.; HARTMAN, G.L.; MIDMORE, D.J. Effect of previous crop on soil population of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatos in Taiwan. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.1367-1372, 1996.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S.; NEVES, M.C.P. Bioensaio para avaliação em massa de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.2065-2072, 1999.

MUSSON, G.; McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.5, p.407-416, 1995.

NASCIMENTO, A.S. **Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro.** 1998. 91p. 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 nematóides.** 2000. 113p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEIXOTO, A.R. et al. Ação antagônica de *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.21, p.219-224, 1995.

REIS, A.V. Reação de cultivares e progênes de tomateiro a dois isolados (biovars I e III) de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith em condições de casa de vegetação. 1996. 44p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

REIS, A.V.; SOUZA, R.M.; SILVEIRA, M.A. Avaliação de progênes e cultivares de tomateiro à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*, Biovar I). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.342, 1996. (Suplemento).

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.1183-1186, 1977.

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

SONODA, R.M.; AUGUSTINE, J.J. Reaction of bacterial wilt-resistant tomato lines to *Pseudomonas solanacearum* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.62, p.464-468, 1978.

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.170-177, 1997.

WINSTEAD, N.N.; KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Madison, v.42, p.628-634, 1952.

CAPÍTULO 4

EFEITO DO ACIBENZOLAR-S-METIL (ASM) NA PROTEÇÃO CONTRA A MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

1 RESUMO

BARRETTI, Patrícia Baston. Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) na proteção contra a murcha bacteriana do tomateiro. In: _____. **Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por associação: endofítia, resistência induzida e varietal.** 2005. Cap.4, p.89-112. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - UFLA, Lavras, MG.*

Para avaliar o efeito do ASM no controle da murcha bacteriana do tomateiro foram conduzidos ensaios em casa de vegetação e em câmara climatizada. O ASM foi aplicado via pulverização foliar e irrigado no solo na mesma concentração e volume (2,5g i.a./100L de água; 25mL/planta), 1 e 7 dias após o transplante de mudas de tomateiro cv. Santa Clara. A inoculação de *Ralstonia solanacearum* ocorreu três dias após a segunda aplicação do produto. A severidade da doença foi avaliada a cada cinco dias e, após a sexta avaliação, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da murcha bacteriana (AACPD). Não houve diferença no modo de aplicação do produto, mas houve redução significativa na severidade da doença em relação à testemunha não tratada. No ensaio em câmara climatizada, observou-se aumento na altura das plantas tratadas com ASM e correlação negativa entre severidade da doença e crescimento das plantas. Para determinar a melhor dose de manutenção e época de aplicação, o ASM foi aplicado via irrigação do solo nas doses de 0,625, 1,25 e 2,5g i.a./100L de água, com intervalos de aplicação de dez dias. As doses de manutenção do ASM apresentaram reduções intermediárias da severidade, diferindo entre si e dos demais tratamentos. Quanto às épocas de aplicação, não houve diferença significativa para o produto aplicado uma ou duas vezes após a inoculação da bactéria desafiante. A aplicação de ASM reduziu a densidade populacional de *R. solanacearum* embora não tenha havido diferença significativa.

*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV e Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

BARRETTI, Patrícia Baston. Effect of acibenzolar-S-metil in the protection against tomato bacterial wilt. In: _____. **Tomato bacterial wilt and possibilities of its control through the association of endophytic bacteria and induced and variety resistance.** 2005. Chap.4, p. 89-112. Thesis (Doctorate in Phytopathology) - UFLA, Lavras, MG.*

The evaluation of the effect of ASM in the control of tomato bacterial wilt was made in greenhouse and in acimatized room. ASM was applied by foliar spraying and by soil drenching at the same concentration and dose (2.5g a.i./100L of water; 25mL/plant), 1 and 7 days after transplanting tomato seedlings cv. Santa Clara. *Ralstonia solanacearum* was inoculated three days after the second application of ASM. Disease severity was assessed every five days. The area under disease progress curve (AUDPC) was calculated after the sixth assessment. There was no difference between procedures of application, but there was significant reduction in disease compared to untreated plants. In the experiment conducted in acimatized room an increase in the height of tomato plants treated with ASM was observed as well as a negative correlation between disease severity and plant growth promotion. To determine the best maintenance dose and application time, ASM was applied by soil drenching using doses of 0.625, 1.25 and 2.5g a.i./100L of water at ten days application intervals. The maintenance doses of ASM provided intermediate severity reductions, differing to each other and to the other treatments. In relation to application times, there was no significant difference when the product was applied whithin one or two times after the inoculation of the pathogenic bacteria. The application of ASM reduced *R. solanacearum* population density, although there was not significant difference when compared with the control plants.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Avdiser), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV and Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, constitui uma doença de grande importância para a cultura do tomateiro, principalmente sob condições de ambiente favoráveis. Em regiões de alta temperatura e umidade, a doença pode comprometer em até 100% a produção, tornando-se limitante à cultura (Rao et al., 1975). O controle dessa doença é extremamente difícil e as medidas adotadas, muitas vezes, não são eficientes, devido à sobrevivência do patógeno no solo, à ampla gama de hospedeiros e à variabilidade da bactéria (Takatsu & Lopes, 1997; Lopes & Reifschneider, 1999).

Como medidas de controle podem ser citados o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas, a seleção de material de plantio livre do patógeno e o uso de microrganismos antagonistas (Michel et al., 1996). A utilização de produtos químicos, incluindo antibióticos e fungicidas, não apresentou sucesso no controle da doença (Takatsu & Lopes, 1997).

A resistência induzida tem demonstrado seu potencial no controle de várias doenças de plantas, podendo ser ativada por agentes indutores abióticos ou bióticos, tais como moléculas sintetizadas ou químicos, não patogênicos, raças incompatíveis de patógenos ou patógenos virulentos (van Loon et al., 1998). Dentro desse contexto, os químicos indutores de resistência surgem como opção promissora no controle de doenças em tomateiro. Dentre as substâncias indutoras de resistência sistêmica adquirida (SAR), encontram-se o probenazole (PBZ), o ácido 2,6-dicloroisonicotínico, o ácido 2,6-dicloroisonicotínico metil éster (INA) e o benzo (1,2,3) tiadiazole-7 ácido carbotióico S-metil éster (acibenzolar-S-metil) entre outros, porém, poucos atingiram a comercialização (Oostendorp et al., 2001).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência mais estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes de Bion®, Actigard™ e Boost® (Venâncio et al., 2000). Na literatura foram citados vários exemplos demonstrando o controle de bacterioses pela utilização do ASM (Romeiro et al., 1999; Castro et al., 1999; Louws et al., 2001; Romero et al., 2001; Silva et al., 2001; Araújo et al., 2002; Silva et al., 2003).

A pulverização foliar de ASM protegeu as raízes de cenoura contra *Erwinia carotovora*. Avaliações até sete dias após a colheita mostraram reduções de 60% a 90% na incidência da podridão mole, quando comparadas à testemunha (Silva, 2002). O uso do ASM também proporcionou redução de 37,2% na severidade do crestamento bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Jesus Júnior et al., 1999).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o melhor método de aplicação, a melhor dose de manutenção e o melhor intervalo de aplicação do ASM, bem como avaliar seu efeito na densidade populacional do patógeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação dos experimentos

Os experimentos foram instalados e conduzidos em casa de vegetação e câmara de crescimento do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

4.2 Produção de mudas

Sementes de tomateiro da cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax®. Vinte e um dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para copos plásticos (500mL) e vasos (5kg) contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1), previamente fumigada com brometo de metila.

4.3 Origem e preservação do patógeno

O isolado de *R. solanacearum* biovar II, proveniente da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da UFLA, foi preservado em peptona-glicerol a -80°C. Para realizar os testes, foi transferido para o meio 523 de Kado & Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas e incubado a 28°C por 48 horas. Em seguida, foi submetido ao teste de patogenicidade. Vinte e um dias após a semeadura, em casa de vegetação, plântulas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram inoculadas, pelo método de imersão das raízes das plântulas na suspensão bacteriana (Winstead & Kelman, 1952) e, posteriormente, transplantadas para vasos com capacidade de 1,5kg contendo solo.

As plantas com sintoma de murcha foram submetidas ao “teste do copo” para confirmação. Observada a exsudação, cortaram-se as hastes das plantas em pequenas seções, as quais foram desinfestadas superficialmente em álcool etílico (70%) por trinta segundos e em hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto e lavadas em água destilada esterilizada. A seguir, as seções foram colocadas perpendicularmente em placas de Petri, com a extremidade imersa em água destilada esterilizada para que ocorresse a exsudação. Após 10 minutos, observada a exsudação bacteriana, fez-se a repicagem, pelo método de estrias paralelas, em placas de Petri contendo meio de cultura 523. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas.

A identificação do isolado em nível de biovar foi feita por meio dos testes de produção de açúcares (maltose, lactose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol), segundo a metodologia de Hayward (1964) (Capítulo 2).

4.4 Efeito do modo de aplicação do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro e no crescimento de plantas

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com seis tratamentos, cinco repetições e duas plantas por parcela. Os tratamentos foram constituídos de plantas tratadas com a suspensão de ASM, via pulverização foliar ou irrigação do solo, inoculadas ou não com *R. solanacearum*, uma testemunha não tratada com a suspensão de ASM e sem inoculação com *R. solanacearum* (testemunha absoluta) e uma testemunha não tratada com a suspensão de ASM e inoculada com *R. solanacearum* (testemunha inoculada).

Mudas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram pulverizadas ou irrigadas via solo com suspensão de ASM na concentração de 2,5g i.a./100L de água, sendo aplicados 25mL da suspensão/planta. O ASM foi aplicado um e sete dias após o transplântio das mudas.

A inoculação com *R. solanacearum* ($A_{540}=0,10$) ocorreu três dias após a segunda aplicação do produto, pela irrigação do solo com 30mL de suspensão bacteriana. No primeiro ensaio, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento climatizada, e no segundo ensaio, em casa de vegetação.

A severidade da murcha bacteriana foi avaliada aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação do patógeno, utilizando-se a escala de Winstead & Kelman (1952) adaptada (Capítulo 2). Após o término das avaliações, os dados de severidade foram integrados ao longo do tempo, obtendo-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela fórmula proposta por Shaner & Finney (1977) (Capítulo 2).

Juntamente com a severidade da doença, avaliou-se o crescimento das plantas de tomateiro tratadas com ASM. Aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação do patógeno, mediu-se a altura e calculou-se a área abaixo da curva de crescimento (AACCP) ou curva de crescimento médio das plantas, pela fórmula:

$$AACCP = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i) \text{ (Shaner \& Finney, 1977)}$$

em que X é a altura da planta, t o tempo e n o número de avaliações no tempo.

Ao término das avaliações de severidade e altura, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea e raízes. Em seguida, a parte aérea foi pesada e as raízes cuidadosamente lavadas em água corrente, secas em papel absorvente e pesadas, ambas em balança eletrônica. Posteriormente, a parte aérea e as raízes foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel e secas em estufa (70°C) até atingirem peso constante.

Os dados de severidade da murcha bacteriana e de altura das plantas de tomate foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de

probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Tukey.

4.5 Efeito de épocas de aplicação e doses de manutenção do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com seis tratamentos e quatro repetições, obedecendo ao arranjo fatorial 3 x 2 com três dosagens de ASM (2,5, 1,25 e 0,625g i.a./100L de água) e duas épocas de aplicação (aos 10 e aos 10 e 20 dias após a inoculação do patógeno) com três tratamentos adicionais. Os tratamentos adicionais constituíram-se de plantas tratadas com a suspensão de ASM sem dose de manutenção, de plantas não tratadas com a suspensão de ASM e sem inoculação com *R. solanacearum* (testemunha absoluta) e de plantas não tratadas com a suspensão de ASM e inoculadas com *R. solanacearum* (testemunha inoculada).

Mudas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram irrigadas via solo com suspensão de ASM na concentração de 2,5g i.a./100L de água, sendo aplicados 25mL da suspensão/planta. O ASM foi aplicado um e sete dias após o transplântio das mudas.

A inoculação com *R. solanacearum* ($A_{540}=0,10$) ocorreu três dias após a segunda aplicação do produto, pela irrigação do solo com 30mL de suspensão bacteriana.

Para a terceira e quarta aplicações do ASM, foram utilizadas as dosagens acima citadas aos 10 e aos 10 e 20 dias após a inoculação do patógeno. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o término do ensaio.

A avaliação da severidade da murcha bacteriana foi realizada conforme descrito no item 4.4.

Os dados de severidade da doença foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os

tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Tukey.

4.6 Efeito do ASM na densidade populacional de *Ralstonia solanacearum*

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos de plantas tratadas, via irrigação do solo, com a suspensão de ASM na concentração de 0,625g i.a./100L com uma dose de manutenção aos 10 dias após a inoculação com o patógeno e com duas doses de manutenção, aos 10 e 20 dias após a inoculação com o patógeno, uma testemunha tratada com a suspensão de ASM sem dose de manutenção, uma testemunha não tratada com a suspensão de ASM e sem inoculação com *R. solanacearum* (testemunha absoluta) e uma testemunha não tratada com a suspensão de ASM e inoculada com *R. solanacearum* (testemunha inoculada).

Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação com a bactéria desafiante, plantas de cada tratamento foram coletadas e levadas ao laboratório para o isolamento e a quantificação do número de colônias de *R. solanacearum*.

As hastes das plantas foram cortadas em pequenas seções, pesadas, desinfestadas superficialmente em álcool etílico (70%) por trinta segundos, em hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto e lavadas em água destilada esterilizada. A seguir, as seções foram maceradas e, de cada macerado, foram obtidas diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-10} , das quais adicionou-se 0,1mL na superfícies de placas de Petri contendo meio 523 e espalhadas com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas e, após esse período, foram feitas a contagem e a estimativa de UFC/g de matéria fresca.



Os dados de densidade populacional de *R. solanacearum* foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do modo de aplicação do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro e no crescimento de plantas

Não houve diferença significativa entre o modo de aplicação do produto, porém tanto a irrigação do ASM no solo quanto a pulverização foliar reduziram a severidade da murcha bacteriana do tomateiro em 27,49% e 16,23%, respectivamente, em relação à testemunha não tratada com o produto (Tabela 1).

Silva et al. (2001), em casa de vegetação, observaram que plantas de tomate tratadas com ASM apresentaram 0% e 29,92% de incidência da murcha bacteriana quando o produto foi aplicado via pulverização foliar ou irrigação do solo, respectivamente, enquanto que, nas plantas testemunhas, a incidência foi superior a 62%.

Araújo et al. (2002), avaliando o modo de aplicação do ASM no controle da murcha bacteriana do tomateiro no campo, verificaram que plantas tratadas com ASM, via irrigação do solo ou pulverização foliar, apresentaram menor incidência da doença quando comparadas à testemunha. No entanto, ao avaliar a severidade, constatou-se que apenas o tratamento em que o ASM foi pulverizado diferiu da testemunha.

Houve diferença significativa na altura e no peso seco da parte aérea e das raízes das plantas tratadas com o produto (Tabela 2). De acordo com a análise de correlação, as variáveis peso de matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes (PMFa, PMSa, PMFr e PMSr) apresentaram correlação positiva entre elas (Tabela 3). Porém, a altura (ALT) apresentou correlação positiva apenas com PMFa, não apresentando diferença significativa entre PMSa, PMFr e PMSr.

Com relação à severidade da doença (AACPD), a ALT, o PMFa, o PMSa, o PMFr e o PMSr tiveram correlação negativa (Tabela 3).

TABELA 1: Modo de aplicação do ASM na redução da área abaixo da curva de progresso da murcha bacteriana (AACPD) do tomateiro

Tratamentos	AACPD	% de controle ³
ASM irrigado	25,00 a ¹	-
ASM pulverizado	25,00 a	-
ASM irrigado+Rs ²	69,25 b	27,49
ASM pulverizado+Rs	80,00 b	16,23
Testemunha inoculada	95,50 c	-
Testemunha absoluta (água)	25,00 a	-

¹Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

²Rs: *Ralstonia solanacearum*

³Em relação à testemunha

TABELA 2: Modo de aplicação do ASM no crescimento de plantas de tomateiro em câmara climatizada

Tratamentos	ALT ³	PMFa ⁴	PMSa ⁵	PMFr ⁶	PMSr ⁷
ASM irrigado	49,40 a ¹	19,55 a	18,02 a	2,43 a	2,20 b
ASM pulverizado	47,89 a	18,39 a	17,01 a	2,43 a	1,82 b
ASM irrigado+Rs ²	39,61 b	3,51 b	2,54 b	0,72 b	0,62 c
ASM pulverizado+Rs	35,41 b	3,36 b	2,48 b	0,56 b	0,48 c
Test. inoculada	32,23 b	21,02 a	19,74 a	3,78 a	3,59 a
Test. absoluta (água)	27,40 b	1,30 b	0,69 b	0,29 b	0,19 c

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

²Rs: *Ralstonia solanacearum*

³altura (cm); ⁴peso de matéria fresca da parte aérea (g); ⁵peso de matéria seca da parte aérea (g); ⁶peso de matéria fresca da raiz (g) e ⁷peso de matéria seca da raiz (g)

TABELA 3: Correlação entre severidade da murcha bacteriana (AACPD) e crescimento de plantas de tomateiro

Tratamentos	ALT ¹	PMFa ²	PMSa ³	PMFr ⁴	PMSr ⁵
AACPD	-0,31*	-0,74*	-0,76*	-0,65*	-0,62*
ALT ¹		0,42**	0,39 NS	0,22 NS	0,21 NS
PMFa ²			0,96*	0,86*	0,83*
PMSa ³				0,85*	0,82*
PMSr ⁵					0,98*

¹altura (cm), ²peso de matéria fresca da parte aérea (g), ³peso de matéria seca da parte aérea (g), ⁴peso de matéria fresca da raiz (g); e ⁵peso de matéria seca da raiz (g)

*Significativo a 1% de probabilidade; **significativo a 5% de probabilidade e NS não significativo

A análise da curva de crescimento médio das plantas (Figura 1) revelou, inicialmente, que aquelas tratadas com ASM, por irrigação do solo ou pulverização foliar, apresentaram crescimento mais rápido do que a testemunha absoluta (plantas não tratadas com o produto). A partir do décimo quarto dia de avaliação, o crescimento das plantas tratadas com ASM e inoculadas com *R. solanacearum* foi mais lento, tendendo a se estabilizar. Já as plantas submetidas à irrigação do solo e pulverização foliar com a suspensão de ASM e não inoculadas com a bactéria desafiante apresentaram crescimento maior e estatisticamente superior ao da testemunha absoluta durante todas as avaliações.

No entanto, Louws et al. (2001) observaram que plantas de tomateiro pulverizadas com ASM (8,75g i.a./100L de água) foram visivelmente menores que as testemunhas e apresentaram redução de 50% no peso médio de matéria seca.

No segundo ensaio, em casa de vegetação, o tratamento com ASM interferiu novamente no crescimento das plantas (Tabela 4), apresentando o

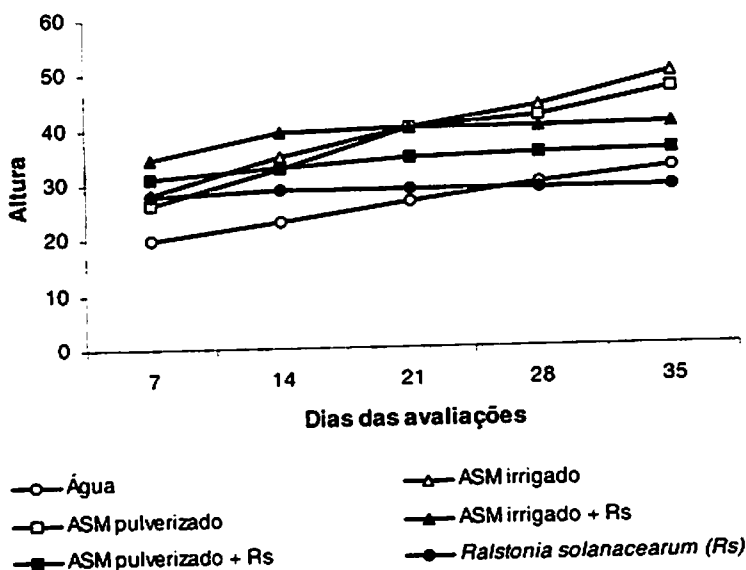


FIGURA 1: Curva de crescimento médio de plantas de tomateiro tratadas ou não com acibenzolar-S-metil (ASM) em câmara climatizada

TABELA 4: Modo de aplicação do ASM no crescimento de plantas de tomateiro em casa de vegetação

Tratamentos	ALT ³	PMFa ⁴	PMSa ⁵	PMFr ⁶	PMSr ⁷
ASM irrigado	34,88 a ¹	20,12 a ²	3,02 a	0,65 a	0,31 a
ASM pulverizado	30,29 b	16,78 b	3,36 a	0,78 a	0,19 b
ASM irrigado+Rs ²	25,86 c	1,98 c	0,81 c	0,42 b	0,03 c
ASM pulverizado+Rs	22,66 c	1,91c	0,69 c	0,44 b	0,03 c
Test. inoculada	21,82 c	16,01 b	2,32 b	0,60 a	0,14 b
Test. absoluta (água)	16,71 d	1,77 c	0,53 c	0,14 c	0,02 c

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

²Rs: *Ralstonia solanacearum*

³altura (cm); ⁴peso de matéria fresca da parte aérea (g); ⁵peso de matéria seca da parte aérea (g); ⁶peso de matéria fresca da raiz (g) e ⁷peso de matéria seca da raiz (g)

mesmo padrão de crescimento em relação ao ensaio anterior (Figura 2). As plantas submetidas ao tratamento com ASM, irrigado no solo ou pulverizado nas folhas, apresentaram crescimento superior à testemunha. Já em plantas tratadas com ASM e inoculadas com a bactéria desafiante o crescimento foi mais lento, mas ainda superior ao das testemunhas. Porém, segundo Romero et al. (2001), o crescimento de plantas de pimentão pulverizadas com ASM nas doses de 4,375g e 8,75g i.a./100L de água não diferiu das testemunhas, as quais não foram tratadas com o produto.

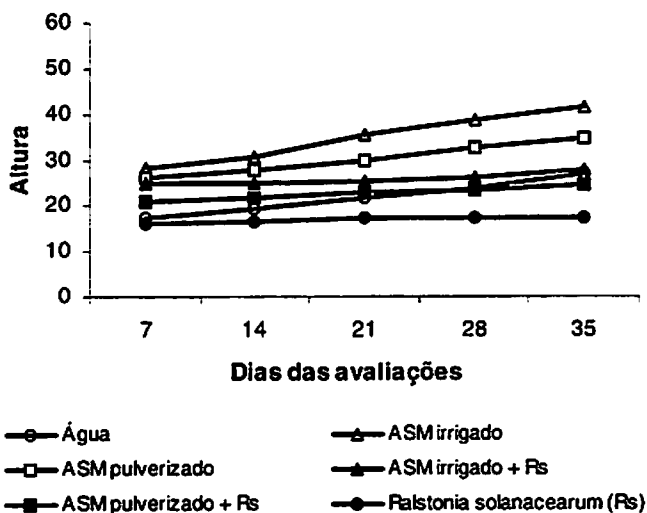


FIGURA 2: Curva de crescimento médio de plantas de tomateiro tratadas ou não com acibenzolar-S-metil (ASM) em casa de vegetação

Ao avaliarem o efeito do ASM na produção de frutos de pimentão, cujas plantas foram cultivadas em área livre de patógenos, Romero et al. (2001) não detectaram diferença significativa no número de emissão de brotações novas, de botões e flores abertas, de frutos por planta e no peso dos frutos de plantas tratadas e não tratadas com o produto. Também foi observado que plantas pulverizadas com ASM produziram frutos menores quando comparadas às testemunhas, apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos. Além disso, houve atraso na maturação dos frutos. Para os autores, a redução na produção de frutos e ou o atraso na maturação sugere que há um custo energético para a planta quando a resistência é induzida.

De acordo com Karban & Kuc (1999), se a defesa despende energia, a conversão de resistência constitutiva em induzida pode resultar em alterações na fisiologia da planta, tais como redução do crescimento e ou menor produção da planta.

5.2 Efeito de épocas de aplicação e doses de manutenção do ASM na severidade da murcha bacteriana do tomateiro

Não houve interação significativa entre doses de manutenção e épocas de aplicação do ASM. Dessa forma, foi realizada a análise individual dos fatores.

As doses de manutenção do ASM proporcionaram reduções variáveis na severidade da murcha bacteriana do tomateiro, diferindo entre si, da testemunha inoculada e do tratamento utilizado como padrão (Tabela 5).

Verificou-se que as plantas tratadas com ASM na dose de 0,625g i.a./100L de água apresentaram redução significativa na severidade da doença (40,27%) quando comparadas à testemunha inoculada e ao tratamento padrão.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos para o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) do tomateiro, em que verificaram-se reduções de 54,66%, 41,08% e 58,82% na severidade da doença,

TABELA 5: Doses de manutenção do ASM na redução da severidade (AACPD) da murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Dose de manutenção (g i.a./100L água)	AACPD	% de controle em relação à testemunha
0,625	41,62 a ¹	40,27
1,25	60,08 b	13,78
2,5	47,34 a	32,06
Tratamento padrão	56,72 b	18,60
Testemunha inoculada	69,68 c	-

¹Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

respectivamente, quando o ASM foi aplicado em doses de manutenção nas concentrações de 2,5, 1,25 e 0,625g i.a./100L de água (Silva et al., 2003). De forma semelhante, Lows et al. (2001) observaram que a redução em 50% da dose recomendada de ASM (8,75g i.a./100L de água) comprometeu o controle da mancha e da pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacteriana do tomateiro no início do aparecimento das lesões, mas, proporcionou controle semelhante ao da dose recomendada no final das avaliações. Já o acréscimo de 100% na dose recomendada (17g i.a./100L de água) não ofereceu vantagens no controle da doença.

No entanto, contrapondo-se aos resultados obtidos no presente trabalho, Castro et al. (1999) observaram redução significativa na proteção de plantas de tomate à pinta bacteriana ao reduzirem a dose de aplicação do ASM de 2,5 para 1,25g i.a./100L de água, mesmo após várias aplicações do produto. Ishida (2004) não observou diferença entre as doses de manutenção testadas na proteção à mancha angular do algodoeiro (*X. axonopodis* pv. *malvacearum*).

Não houve diferença significativa entre as épocas de aplicação de doses de manutenção do ASM (Tabela 6).

TABELA 6: Épocas de aplicação do ASM na severidade (AACPD) da murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Dose (g i.a./100L água)	Época de aplicação do ASM (dias após a inoculação)	
	10	10 e 20 dias
0,625	42,73 ¹ a ²	40,5 a
1,25	55,94 a	64,22 a
2,5	44,14 a	50,55 a

¹Área abaixo da curva de progresso da murcha bacteriana do tomateiro (AACPD)

²Médias seguidas de mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Segundo Araújo et al. (2002), as plantas de tomate que receberam sete aplicações de ASM a intervalos semanais, na dose recomendada para a cultura (2.5g i.a./100L de água), tiveram menor severidade da murcha bacteriana, expressa pela porcentagem de folhas murchas, em relação à testemunha.

5.3 Efeito do ASM na densidade populacional de *Ralstonia solanacearum*

Não houve diferença significativa entre a densidade populacional do patógeno após a aplicação de uma ou duas doses de manutenção do ASM (Tabela 7). No entanto, foi observada maior densidade populacional de *R. solanacearum* em plantas não tratadas com ASM (Figura 3).

Louws et al. (2001) verificaram redução significativa na densidade populacional de *X. vesicatoria* em plântulas pulverizadas com ASM quando comparadas às plântulas pulverizadas com água. Porém, em outro experimento, dependendo da época de amostragem, os autores observaram que as populações epifíticas de *X. vesicatoria* e *P. syringae* pv. *tomato* não foram afetadas quando comparada à testemunha (pulverizada com água).

TABELA 7: ASM na densidade populacional média (UFC/g tecido fresco) de *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomateiro

Tratamentos	Densidade populacional
ASM sem dose de manutenção	4,53 X 10 ⁶ a ¹
ASM com uma aplicação de manutenção ²	4,24 X 10 ⁶ a
ASM com duas aplicações de manutenção ³	3,94 X 10 ⁶ a
Testemunha inoculada (<i>R. solanacearum</i>)	5,02 X 10 ⁶ a

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

²Uma aplicação de manutenção de ASM realizada dez dias após a inoculação com o patógeno

³Dois aplicações de ASM realizadas dez e vinte dias após a inoculação com o patógeno

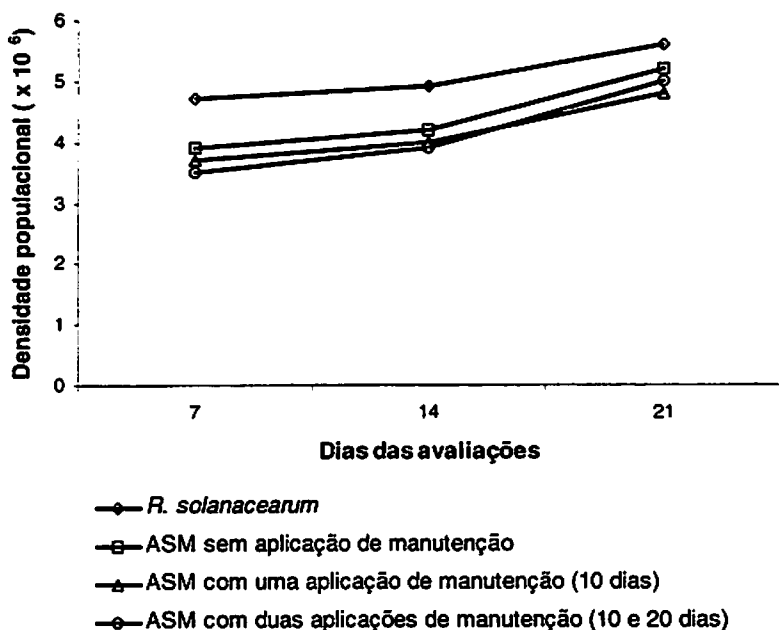


FIGURA 3: Densidade populacional (10⁶ UFC/g de tecido fresco) de *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomateiro tratadas ou não com acibenzolar-S-metil (ASM)

6 CONCLUSÕES

- 1 Os modos de aplicação do ASM testados foram igualmente eficazes na proteção contra a murcha bacteriana do tomateiro.
- 2 A melhor proteção contra a murcha bacteriana foi obtida após duas aplicações do ASM (2,5g i.a./100L de água) e uma aplicação de manutenção (0,625g i.a./100L de água), vinte dias após a inoculação com o patógeno.
- 3 A aplicação de ASM reduziu a densidade populacional de *R. solanacearum*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.S.P. et al. **Resistência à murcha bacteriana em tomateiro, induzida pelo acibenzolar-S-methyl**. Syngenta Proteção de Cultivos/Conselho Syngenta de Fitopatologistas, 2002. 1 CD ROM.
- CASTRO, R.M.; AIZAWA, J.; GARCIA, L.D. **Protection on tomatoes against bacterial speck and tomato canker CGA 245.704 application**. São Paulo: Novartis Biocience, 1999. 8p.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows Versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.
- HAYWARD, A.C. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.27, p.265-277, 1964.
- 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 em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- JESUS JUNIOR, W.C. et al. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.293, 1999. (Suplemento).
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, p.969-976, 1970.
- KARBAN, R.; KUC, J. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview. In: AGRAWAL, A.A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture**. St. Paul: APS, 1999. p.1-18.
- LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p.56-60, 1999.
- LOUWS, F.J. et al. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, p.481-488, 2001.

MICHEL, V.; HARTMAN, G.L.; MIDMORE, D.J. Effect of previous crop on soil population of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.1367-1372, 1996.

OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.19-28, 2001.

RAO, M.V.B.; SOHI, H.S.; TIKOO, S.K. Reaction of wilt tomato varieties and lines to *Pseudomonas solanacearum* in India. **Plant Disease Reporter**, v.59, p.734-736, 1975.

ROMEIRO, R.S. et al. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. campestris* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.255, 1999. (Suplemento).

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

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.1183-1186, 1977.

SILVA, L.H.C.P. et al. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.294-295, 2001. (Suplemento).

SILVA, L.H.C.P. et al. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro pelo ativador de defesa de plantas acibenzolar-S-metil (ASM). **Suuma Phytopathologica**, Jaboticabal, v.29, p.177-181, 2003.

SILVA, R.A. **Indução de resistência em *Daucus carota* com o acibenzolar-s-methyl visando reduzir a incidência de podridão mole (*Erwinia carotovora*) durante a pós-colheita.** Syngenta Proteção de Cultivos/Conselho Syngenta de Fitopatologistas, 2002. 1 CD ROM.

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.170-177, 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, 1998.

VENÂNCIO, W.S. et al. Novos fungicidas. II - famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.59-92, 2000.

WINSTEAD, N.N.; KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Madison, v.42, p.628-634, 1952.

CAPÍTULO 5

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATEIRO INDUZIDA POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

1 RESUMO

BARRETTI, Patrícia Baston. Promoção de crescimento de plantas de tomateiro induzida por bactérias endofíticas. In: _____. **Murcha bacteriana do tomateiro e possibilidades de seu controle por associação: endofítia, resistência induzida e varietal**. 2005. Cap.5, p.113-141. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - UFLA, Lavras, MG.*

A partir de 150 isolados de bactérias endofíticas obtidos de folhas, caules e raízes de tomateiros sadios testados para o controle da murcha bacteriana, 53 isolados destacaram-se quanto à habilidade em promover o crescimento de plantas de tomateiro. Dentre estes, os 10 isolados que proporcionaram as maiores alturas foram selecionados para testes posteriores. Para a introdução das bactérias endofíticas em plântulas de tomateiro cv. Santa Clara utilizou-se o corte do hipocótilo. Dez dias após o transplante das seções de parte aérea, iniciaram-se as avaliações de altura e número de folhas e folíolos das plantas, as quais aconteceram semanalmente. Após a sexta avaliação, mensuraram-se a área foliar e o peso da matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz das plantas. O isolado UFV-E49 apresentou melhor resultado para altura, área foliar, número de folhas e peso da matéria fresca e seca, tanto da parte aérea quanto da raiz. Foram determinados os teores de macro e micronutrientes das plantas. A quantidade encontrada de N, P, K, Ca, Mg, Cu e Zn na parte aérea e de N, P, Mg e Mn na raiz das plantas tratadas diferiu da testemunha. Os isolados UFLA 11-LS e UFV-E49 propiciaram a maior eficiência de absorção de P em relação à testemunha. O primeiro isolado também foi mais eficiente na utilização de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe e Zn e o segundo de Mn, embora os maiores teores de N, P, K, Mg e Zn tenham sido encontrados na parte aérea das plantas tratadas com o isolado UFV-E49.

*Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV e Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

BARRETTI, Patrícia Baston. Tomato plant growth promotion induced by endophytic bacteria. In: _____. **Tomato bacterial wilt and possibilities of its control through the association of endophytic bacteria and induced and variety resistance** 2005. Chap.5, p. 113-141. Thesis (Doctorate in Phytopathology) - UFLA, Lavras, MG.*

One hundred and fifty isolates of endophytic bacteria from leaves, stems and roots of healthy tomatoes were tested to control bacterial wilt. Fifty three isolates showed ability to promote tomato plant growth, among them, ten isolates that provided the largest plant heights were selected for subsequent tests. A cut in the hypocotyls was made in order to apply the endophytic bacteria into tomatoes seedlings, cv. Santa Clara. Weekly assessments of plant height and number of leaves and leaflets were carried out ten days after transplanting the upper portion of the cut seedlings. After the sixth evaluation, the leaf area and the fresh and dry weight of the aerial part of plants and the roots were measured. Isolate UFV-E49 provided the largest height, leaf area, number of leaves, and fresh and dry weight of the aerial plant part as well as to the roots. Levels of macro and micro plant nutrients were determined. The levels of N, P, K, Ca, Mg, Cu and Zn in the aerial part of plants and N, P, Mg and Mn in the root of treated plants differed from untreated plants. The isolates, UFLA 11-LS and UFV-E49 provided the largest rate of P uptake in relation to untreated plants. Plants treated with the isolate UFLA 11-LS were also the most efficient in the utilization of N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe and Zn as well as plants treated with the isolate UFV-E49 in the utilization of Mn, although the highest contents of N, P, K, Mg and Zn have been found in the aerial part of plants treated with isolate UFV-E49.

*Advising Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Avdiser), Reginaldo da Silva Romeiro - UFV and Edson Ampélio Pozza - UFLA (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

As bactérias endofíticas têm sido associadas à promoção de crescimento em diversas culturas, incluindo tomate e alface (Bashan et al., 1989; van Peer & Schippers, 1989), batata (Frommel et al., 1991; Sturtz, 1995; van Peer & Schippers, 1989), milho (Hinton & Bacon, 1995; Lalande et al., 1989), pepino (van Peer & Schippers, 1989), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989).

No trabalho de Sturtz (1995), aproximadamente 10% das bactérias endofíticas isoladas de tubérculos de batata promoveram o crescimento das plantas. A introdução do isolado BH72 da bactéria endofítica diazotrófica *Azoarcus* sp. em plantas de arroz também resultou em crescimento significativo das plantas (Hurek et al., 1994).

Os efeitos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule e da raiz e na formação de pêlos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (Sturtz, 1995; Pillay & Nowak, 1997).

Os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento das plantas por bactérias endofíticas podem ser divididos em diretos e indiretos. Quando o estímulo do crescimento das plantas é direto, a endofítica produz fitormônios ou substâncias análogas destes reguladores de crescimento capazes de estimular o desenvolvimento da planta (Bashan & Holguin, 1997). Quando o efeito é indireto, o crescimento é estimulado principalmente por meio do controle biológico, ou seja, da redução da população de microrganismos deletérios ou patogênicos às plantas (Hallmann et al., 1997).

Na literatura também há relatos de que as bactérias endofíticas promovem o crescimento das plantas pelo aumento da absorção de nutrientes minerais e água (Hallmann et al., 1997; Lazarovits & Nowak, 1997). Neste caso,

acredita-se que o aumento no crescimento seja devido à melhoria proporcionada ao estado nutricional das plantas, principalmente em solos de baixa fertilidade.

O conceito de eficiência nutricional das plantas na utilização de um nutriente inclui processos pelos quais elas absorvem, translocam, acumulam e utilizam melhor este nutriente para a produção de matéria seca ou grãos, em condições normais ou adversas (Pozza, 2004; Martinez et al., 1993).

Vários mecanismos relacionados às características morfológicas e fisiológicas das plantas contribuem para o uso eficiente de nutrientes, tais como: sistema radicular extensivo, o qual possibilita a exploração de maior volume de solo, alta relação entre raízes e parte aérea, maior eficiência de absorção ou de utilização de nutrientes e capacidade de manter o metabolismo normal com baixo teor de nutrientes nos tecidos (Fageria & Baligar, 1993).

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade de dez isolados previamente selecionados em promover o crescimento de plantas de tomateiro, bem como averiguar se estes isolados influenciaram na eficiência nutricional das plantas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalação dos experimentos

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Antes da instalação do experimento, encaminhou-se amostra do solo ao Departamento de Ciência do Solo da UFLA, para realizar análise físico-química (Tabela 1).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 11 tratamentos constituídos por 10 isolados endofíticos (UFV-E17, UFLA-E22, UFLA-E25, UFLA-E26, UFLA-E27, UFLA-E29, UFLA-E49, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS e UFLA 11-LS) e uma testemunha absoluta. Cada tratamento foi repetido quatro vezes, sendo cada parcela constituída por duas plantas.

4.2 Origem, isolamento e preservação dos isolados de bactérias endofíticas

Os isolados de bactérias endofíticas UFLA-E17, UFLA-E22, UFLA-E25, UFLA-E26, UFLA-E27, UFLA-E29, UFLA-E49, UFLA 06-LS, UFLA 08-LS e UFLA 11-LS, previamente selecionados (Capítulo 2), obtidos de plantas de tomateiro provenientes das regiões de Viçosa e Lavras, Minas Gerais, foram preservados em peptona-glicerol a -80°C.

Para o uso experimental, as bactérias endofíticas foram transferidas para placas de Petri contendo meio 523 de Kado & Heskett (1970) e incubadas a 28°C em câmara de crescimento. Após 48 horas, foram preparadas as suspensões bacterianas adicionando-se água de torneira e homogeneizando-se com a alça de Drigalsky.

TABELA 1: Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento. Laboratório de Solos da UFLA.

Atributos	Resultados
pH em água	5,5
P (mg/dm ³)	0,4
K (mg/dm ³)	11
Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³)	0,8
Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	0,2
Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	0,0
H+Al (cmol _c /dm ³)	1,9
SB (cmol _c /dm ³)	1,0
(t) (cmol _c /dm ³)	1,0
(T) (cmol _c /dm ³)	2,9
V %	35,2
Matéria orgânica (dag/kg)	0,5
Areia (%)	10,0
Silte (%)	31,0
Argila (%)	59,0
Classe textural	Argilosa
P-rem (mg/L)	2,0
Zn (mg/dm ³)	0,2
Fe (mg/dm ³)	34,4
Mn (mg/dm ³)	2,0
Cu (mg/dm ³)	0,5
S (mg/dm ³)	5,8

SB: soma de bases trocáveis. CTC (t): capacidade de troca catiônica efetiva. CTC (T): capacidade de troca catiônica a pH 7,0. V: índice de saturação de bases, m: índice de saturação por Al. MO: matéria orgânica e P-rem: fósforo remanescente

4.3 Introdução das bactérias endofíticas em plantas de tomateiro

A técnica eleita foi o corte do hipocótilo, descrita e patenteada por Kijima et al. (1995), como se segue. Plântulas de tomateiro da cultivar Santa Clara, cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial Plantmax®, foram seccionadas na região do hipocótilo quando apresentavam o segundo par de folhas definitivas. O sistema radicular foi descartado e o restante

da planta imerso por seis horas em suspensão de células de cada isolado de bactéria endofítica ajustada ao espectrofotômetro para $A_{540}=0,2$. Posteriormente, as seções de parte aérea foram plantadas em vasos de 5kg de capacidade contendo a mistura de solo, areia e esterco (2:1:1), previamente fumigada com brometo de metila, aguardando-se o enraizamento.

Para as plantas testemunha utilizou-se o mesmo procedimento, no entanto, a parte aérea foi imersa em água destilada esterilizada. As plantas permaneceram em casa de vegetação até o término do experimento.

4.4 Avaliação do potencial de promoção de crescimento de tomateiro por isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados em ensaios em casa de vegetação

As avaliações iniciaram-se dez dias após a introdução das bactérias endofíticas em plântulas de tomateiro e aconteceram semanalmente, durante 45 dias, nas quais foram mensuradas a altura e o número de folhas e folíolos das plantas. Após o término da sexta avaliação, mensuraram-se o peso de matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz e a área foliar das plantas.

4.4.1 Matéria fresca das plantas

Ao término das avaliações de altura e do número de folhas e folíolos, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea e raízes. Em seguida, as partes aéreas foram pesadas em balança eletrônica e as raízes cuidadosamente lavadas em água corrente e em água destilada, secas com papel absorvente e pesadas. Posteriormente, foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel.

4.4.2 Área foliar das plantas

Após a obtenção do peso de matéria fresca, as folhas foram cuidadosamente destacadas e “scaneadas”. As imagens digitalizadas foram transferidas para o microcomputador e, posteriormente, processadas com o programa Quant v. 1.0.1 (Vale et al., 2003), obtendo-se a área foliar total de cada planta em cm².

4.4.3 Matéria seca e análise nutricional das plantas de tomateiro

A parte aérea das plantas de tomateiro foi cuidadosamente lavada em água corrente e em água destilada, acondicionada separadamente em sacos de papel e seca em estufa (70°C) até atingir peso constante. O mesmo procedimento de secagem foi empregado para as raízes. Em seguida, procederam-se a pesagem e a moagem do material, tanto da parte aérea quanto das raízes. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras para a determinação dos teores de N (nitrogênio), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio), S (enxofre), Cu (cobre), Fe (ferro), Mn (manganês) e Zn (zinco), segundo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997).

O teor de N foi determinado pelo método “Kjedahl”. As amostras foram submetidas à digestão nitroperclórica em bloco digestor para determinar os teores de macro e micronutrientes. Neste extrato, os teores de Ca, Mg, Cu, Fe e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, o de K por fotometria de chama de emissão e o de S por turbidimetria.

Para o estudo da eficiência nutricional dos isolados endofíticos, as eficiências de absorção, translocação e utilização dos macro e micronutrientes foram calculadas conforme os modelos apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Modelos de eficiência nutricional utilizados no presente trabalho

Eficiências	Modelos	Autores
Eficiência de utilização	$\frac{\text{(Matéria seca total)}^2}{\text{Conteúdo na matéria seca total}}$	Siddiqi & Glass (1981)
Eficiência de utilização	$\frac{\text{Conteúdo total absorvido}}{\text{Matéria seca da raiz}}$	Swiader et al. (1994)
Eficiência de translocação	$\frac{\text{Conteúdo na parte aérea} \times 100}{\text{Conteúdo na planta toda}}$	Li et al. (1991)

4.5 Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em fixar nitrogênio (N₂)

Para verificar se os isolados endofíticos selecionados como promotores de crescimento atuam como fixadores de nitrogênio, foram realizados testes no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos constituídos por 10 isolados endofíticos e uma testemunha (frasco sem a inoculação de bactérias). Cada tratamento foi repetido cinco vezes.

Fragmentos de colônias puras dos isolados endofíticos foram inoculados no centro do meio de cultura semi-sólido, sem nitrogênio e semi-específico para o diazotrófico desejado, ou seja, os meios JNFb, NFb e FAM, para *Herbaspirillum* sp., *Azospirillum* sp., e *A. amazonense*, respectivamente (Dobereiner et al. 1995). Os frascos foram incubados a 28°C por 10 dias. O crescimento bacteriano foi avaliado observando-se a presença ou ausência de uma película formada nos meios de cultura.

4.6 Análise estatística

Os dados de altura, número de folhas e folíolos, área foliar e peso de matéria fresca e seca tanto da parte aérea quanto da raiz das plantas foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram agrupadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Scott-Knott.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do potencial de promoção de crescimento de tomateiro por isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados em ensaios em casa de vegetação

O efeito dos isolados endofíticos na promoção de crescimento variou em função dos parâmetros avaliados, permitindo selecionar, para cada parâmetro, um isolado ou um grupo de isolados com potencial para a promoção de crescimento (Tabela 3).

Estes isolados foram estatisticamente superiores à testemunha, exceto para o parâmetro número de folíolos (NFL), o qual não diferiu entre os tratamentos. Os isolados UFV-E17, UFV-E27 e UFV-E29 apresentaram PMSr 10%, 15% e 15%, respectivamente, inferiores ao da testemunha (100%).

De maneira geral, os maiores incrementos foram proporcionados pelo isolado UFV-E49, cujos aumentos na altura (ALT), área foliar (AF), número de folhas (NF), peso da matéria fresca (PMFa) e seca da parte aérea (PMSa), peso da matéria fresca (PMFr) e seca das raízes (PMSr) foram 23,40%, 105,80%, 19,53%, 42,40%, 61,64%, 100% e 225%, respectivamente, maiores do que a testemunha. Este isolado não diferiu do UFLA 11-LS para os parâmetros ALT e NF (Tabela 3).

Em consonância com os resultados obtidos neste trabalho, Frommel et al. (1991) verificaram que o isolado não fluorescente de *Pseudomonas* sp., PsJN, induziu aumento significativo no número de raízes de batateira (24% a 196%), no peso de matéria seca de raiz (44% a 211%), no comprimento do caule (26% a 28%), na formação de pêlos foliares (55% a 110%) e no conteúdo total de lignina (43%).

De maneira semelhante, Chanway et al. (1997) obtiveram aumentos de 33% e 57% na biomassa de plântulas de pinheiro tratadas com os isolados PW2

TABELA 3: Bactérias endofíticas previamente selecionadas na promoção de crescimento de plantas de tomateiro

Isolados	ALT	AF	NF	NFL	PMFa	PMSa	PMFr	PMSr
UFV17	49,8 b ¹	1753,4 b	69,9 b	9,9 a	60,1 b	61,0 b	0,94 b	0,18 b
UFV22	50,1 b	1710,1 b	107,3 a	8,8 a	61,1 b	61,1 b	1,19 a	0,26 b
UFV25	55,7 a	1456,2 c	111,0 a	9,0 a	70,0 b	70,0 b	1,16 a	0,22 b
UFV26	53,8 a	1623,3 b	110,3 a	10,1 a	66,0 b	66,0 b	0,99 b	0,26 b
UFV27	55,9 a	1717,7 b	111,1 a	8,3 a	70,1 b	71,0 b	0,86 b	0,17 b
UFV29	52,5 b	1900,2 a	106,7 a	13,3 a	70,4 b	70,4 b	0,96 b	0,17 b
UFV49	58,7 a	2092,6 a	114,3 a	11,9 a	86,0 a	86,1 a	1,48 a	0,65 a
UFLA06	51,0 b	1753,4 b	107,1 a	10,5 a	67,3 b	67,3 b	0,90 b	0,20 b
UFLA08	54,6 a	1954,0 a	115,0 a	12,3 a	71,3 b	71,3 b	1,00 b	0,20 b
UFLA11	53,1 a	1694,6 b	112,7 a	13,0 a	73,2 b	73,2 b	0,99 b	0,21 b
Test.	47,6 b	1016,8 d	95,7 b	11,6 a	60,4 b	60,4 b	0,74 b	0,20 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott. a 5% de probabilidade

ALT: altura, AF: área foliar.; NF: número de folhas, NFL: número de folíolos.; PMFa: peso de matéria fresca da parte aérea, PMSa: peso de matéria seca da parte aérea, PMFr: peso de matéria fresca da raiz e PMSr: peso de matéria seca da raiz

e SM3-RN de *Bacillus polymyxa* e *Pseudomonas chloroaphis*, respectivamente. Os autores também relataram aumentos na altura e no comprimento de raízes das plântulas inoculadas com estes isolados variando entre 23% e 132%.

A maioria dos trabalhos relatados na literatura, mostram que os principais mecanismos pelo quais as bactérias endofíticas promovem o crescimento das plantas são a fixação de nitrogênio (Boddey & Dobereiner, 1995) e o controle biológico de fitopatógenos, seja este pelo antagonismo direto ou pela indução de resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997). No entanto, alguns trabalhos relatam que as bactérias endofíticas também podem promover o crescimento de plantas pela produção de auxinas, citocininas, etileno e pelo aumento da absorção de nutrientes minerais e água (Hallmann et al., 1997; Lazarovits & Nowak, 1997).

Segundo Chanway (1997), a eficácia da promoção de crescimento em pinheiro estimulada por quatro isolados de bactérias endofíticas foi alterada significativamente quando as plântulas foram transplantadas para solo de floresta contendo patógenos em comparação ao transplante em solo isento de patógenos. Os isolados W2 e W3 de actinomiceto e *Phyllobacterium* sp., respectivamente, estimularam o crescimento das plântulas somente na ausência dos patógenos, enquanto que em sua presença o crescimento foi inibido. De acordo com o autor, a promoção de crescimento causada pelos isolados W2 e W3 não ocorreu pela supressão da microflora deletéria à planta, mas sim por um outro mecanismo ainda não elucidado. Entretanto, o isolado de actinomiceto (N1) e o de *Bacillus* sp. (N4) estimularam o crescimento das plântulas de pinheiro apenas na presença do solo de floresta, o que sugere que estes isolados tenham agido por biocontrole e, possivelmente, por indução de resistência no hospedeiro.

Em outro experimento, Chanway (2001) relatou que o isolado endofítico PW2-R, de *B. polymyxa*, possui atividade de nitrogenase, o que explica o crescimento de plântulas de pinheiro em condições de deficiência de nitrogênio e ausência de fixação significativa de nitrogênio rizosférico.

5.2 Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em fixar nitrogênio (N₂)

Nenhum dos dez isolados de bactérias endofíticas selecionados cresceu em meios de cultura semi-específicos para *Herbaspirillum* sp. e *Azospirillum* sp., considerados os gêneros de maior relevância como fixadores de nitrogênio. Tratando-se de bactérias endofíticas diazotróficas, acreditava-se que a fixação de N₂ e a liberação de parte do nitrogênio fixado para a planta fossem os principais modos de ação sobre o hospedeiro. Porém, nem sempre o efeito positivo no crescimento de plantas pode ser atribuído à fixação de N₂. Alguns isolados de

Azospirillum spp. produzem hormônios de crescimento em cultura pura (Bottini et al., 1989) e sabe-se que essas substâncias alteram a morfologia do sistema radicular, aumentam a densidade das raízes e interferem no crescimento das plantas. No caso deste experimento, as bactérias endofíticas estudadas não foram consideradas fixadoras de nitrogênio por não crescerem em meio de cultura sem o nutriente.

5.3 Teor de nutrientes nas plantas de tomateiro

Pelo resultado da análise do solo (Tabela 1), os valores necessários para a cultura do tomateiro foram considerados baixos para o Ca, Mg, S, K e Cu e muito baixos para o P, Zn e Mn, de acordo com Ribeiro et al. (1999). Somente o Fe encontrava-se em nível adequado para a cultura, segundo os mesmos autores. No entanto, não foi realizada nenhuma adubação durante toda a condução do experimento para evitar que os efeitos provenientes do crescimento induzido pelas bactérias endofíticas fossem mascarados pelo efeito do adubo.

Ao analisar-se o teor destes nutrientes na parte aérea e nas raízes das plantas de tomateiro, observou-se que muitos deles foram influenciados positivamente pelos isolados endofíticos avaliados (Tabelas 4 e 5). Assim sendo, notou-se que as concentrações encontradas de N, P, K, Ca, Mg, Cu e Zn na parte aérea e de N, P, Mg e Mn nas raízes de plantas de tomateiro tratadas diferiram da testemunha. Para os teores de Fe no tecido foliar e de Ca e Zn nas raízes não houve diferença entre os tratamentos. As plantas tratadas com alguns isolados endofíticos apresentaram quantidades de S e Mn na parte aérea (Tabela 4) e de K, S, Cu e Fe nas raízes inferiores ao da testemunha (Tabela 5).

A concentração dos nutrientes no tecido foliar encontrou-se abaixo do valor considerado ideal por Martinez et al. (1999), para todos os nutrientes, exceto para os íons Cu, Fe, Mn e Zn (Tabela 4). Porém, observaram-se os

TABELA 4: Bactérias endofíticas previamente selecionadas e teor de nutrientes da parte aérea de plantas de tomateiro

Isolados	N ²	P	K	Ca	Mg	Cu ³	Zn
UFV17	14,80 c ¹	1,38 b	15,04 b	10,01 d	2,16 b	49,38 a	317,66 a
UFV22	13,50 c	1,43 b	15,98 b	9,83 d	2,37 a	35,34 b	252,23 b
UFV25	13,91 c	1,50 b	15,64 b	9,85 d	1,97 b	43,69 a	282,62 a
UFV26	15,66 b	1,64 a	13,01 a	11,76 b	2,23 a	43,56 a	304,58 a
UFV27	14,14 c	1,83 a	19,09 a	13,56 a	2,33 a	49,01 a	252,30 b
UFV29	15,19 b	1,75 a	16,91 b	10,92 c	2,04 b	45,41 a	282,23 a
UFV49	16,89 a	1,67 a	17,93 a	11,81 b	2,29 a	38,29 b	287,12 a
UFLA06	13,32 c	1,82 a	18,94 a	12,48 b	2,10 b	45,38 a	261,99 b
UFLA08	14,53 c	1,54 b	15,75 b	11,04 c	2,09 b	38,16 b	233,87 b
UFLA11	13,93 c	1,57 b	15,64 b	12,12 b	2,09 b	45,90 a	242,85 b
Test.	13,89 c	1,52 b	15,15 b	12,26 b	1,98 b	37,54 b	227,71 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²macronutrientes: g.kg⁻¹

³micronutrientes:mg.kg⁻¹

TABELA 5: Bactérias endofíticas previamente selecionadas e teor de nutrientes da raiz de plantas de tomateiro

Isolados	N ²	P	Mg	Mn ³
UFV17	15,29 a ¹	1,79 b	1,39 b	325,20 b
UFV22	16,19 a	1,87 b	1,58 a	523,44 a
UFV25	16,65 a	1,65 c	1,37 b	370,56 b
UFV26	13,47 c	1,81 b	1,70 a	405,26 b
UFV27	16,31 a	2,03 a	1,53 a	413,68 b
UFV29	16,19 a	1,92 a	1,55 a	380,74 b
UFV49	14,81 b	1,76 b	1,28 b	430,09 b
UFLA06	14,4 b	1,65 c	1,26 b	333,66 b
UFLA08	12,52 c	1,57 c	1,39 b	403,73 b
UFLA11	16,06 a	1,53 c	1,50 a	369,21 b
Test.	14,91 b	1,66 c	1,35 b	394,09 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²macronutrientes: g.kg⁻¹

³micronutrientes:mg.kg⁻¹

maiores teores de N, P, K, Mg e Zn na parte aérea das plantas tratadas com UFV-E49.

A introdução da endófitica diazotrófica *Azospirillum* sp. em cereais mostrou-se eficiente em aumentar a concentração de nitrogênio e o acúmulo de matéria seca (Boddey & Dobereiner, 1995). De maneira semelhante, a introdução de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em sorgo aumentou o teor de nitrogênio nas plantas e interferiu no tamanho das raízes, tornando-as mais compridas e ramificadas (Isopi et al., 1995).

5.4 Eficiência nutricional de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Foram observadas diferenças significativas entre as plantas de tomateiro tratadas com os vários isolados de bactérias endofíticas quanto à eficiência de utilização (EU) (Tabelas 6 e 7), de absorção (EA) (Tabelas 8 e 9) e de translocação (ET) (Tabelas 10 e 11) de macronutrientes e micronutrientes.

O isolado UFLA 11-LS propiciou a maior EU de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe e Zn, não diferindo do isolado UFV-E49 para os nutrientes Ca, S, Cu e Fe (Tabelas 6 e 7), indicando maiores capacidades de produzir matéria seca total por unidade absorvida destes íons. As maiores EU de Mn foram obtidas pelos isolados UFV-E49 e UFV-E29. No entanto, a EU do isolado UFLA 11-LS ($0,15 \text{ mg}^2 \mu\text{g}^{-1}$) para este mineral foi significativamente menor do que a daqueles isolados ($0,16$ e $0,17 \text{ mg}^2 \mu\text{g}^{-1}$, respectivamente), porém maior que a da testemunha ($0,10 \text{ mg}^2 \mu\text{g}^{-1}$).

Os dados apresentados no presente experimento não estão de acordo com as informações relatadas por Sala (2002), em que a introdução de bactérias endofíticas diazotróficas em plantas de trigo influenciou negativamente o teor e a eficiência de utilização do nitrogênio e não influenciou o teor e a eficiência de

TABELA 6: Eficiência de utilização (EU) de macronutrientes de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	N ²	P	K	Ca	Mg	S
UFV17	3,73 c	40,69 b	3,70 b	5,51 a	25,64 c	11,40 b
UFV22	4,08 b	38,57 b	3,44 c	5,63 a	23,20 c	12,02 b
UFV25	4,41 b	40,69 b	3,86 b	6,15 a	30,78 b	16,09 a
UFV26	3,73 c	35,73 c	3,11 c	4,99 b	26,21 c	11,64 b
UFV27	4,44 b	35,18 c	3,29 c	4,63 b	27,41 c	12,30 b
UFV29	4,10 b	36,22 c	3,67 b	5,71 a	30,40 b	13,10 b
UFV49	4,00 b	40,17 b	3,78 b	5,72 a	29,48 b	15,68 a
UFLA06	4,40 b	32,32 c	3,08 c	4,68 b	27,77 c	11,41 b
UFLA08	4,38 b	41,22 b	4,02 b	5,75 a	30,86 b	16,19 a
UFLA11	5,63 a	49,25 a	4,96 a	6,38 a	37,03 a	17,18 a
Test.	3,41 c	31,23 c	3,11 c	3,87 c	23,89 c	9,97 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade
²g².mg⁻¹

TABELA 7: Eficiência de utilização (EU) de micronutrientes de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	Cu ²	Fe	Mn	Zn
UFV17	1,15 b ¹	0,034 b	0,12 c	0,17 c
UFV22	1,54 a	0,034 b	0,13 c	0,22 c
UFV25	1,58 a	0,038 b	0,13 c	0,21 c
UFV26	1,33 b	0,036 b	0,14 b	0,19 c
UFV27	1,29 b	0,042 b	0,15 b	0,25 c
UFV29	1,37 b	0,047 a	0,17 a	0,22 c
UFV49	1,68 a	0,048 a	0,16 a	0,23 c
UFLA06	1,29 b	0,041 b	0,12 c	0,22 c
UFLA08	1,66 a	0,039 b	0,14 b	0,27 b
UFLA11	1,75 a	0,052 a	0,15 b	0,32 a
Test.	1,26 b	0,030 b	0,10 c	0,21 c

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade
²mg².µg⁻¹

TABELA 8: Eficiência de absorção (EA) de macronutrientes de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	N ²	P	K	Ca	Mg	S
UFV17	163,86 a	17,31 b	180,85 a	79,30 a	19,35 a	38,55 a
UFV22	85,37 a	10,02 b	104,64 a	42,42 a	11,83 a	18,75 b
UFV25	139,55 a	14,39 b	148,95 a	65,71 a	15,24 a	25,51 b
UFV26	119,59 a	14,14 b	145,80 a	65,49 a	16,25 a	30,10 b
UFV27	185,46 a	13,63 b	192,13 a	92,21 a	21,21 a	41,04 a
UFV29	190,15 a	15,11 b	216,16 a	111,14 a	24,44 a	48,55 a
UFV49	127,71 a	21,63 a	143,74 a	64,22 a	14,28 a	24,75 b
UFLA06	139,91 a	17,52 b	175,73 a	85,58 a	16,95 a	36,24 a
UFLA08	135,51 a	15,71 b	155,68 a	78,35 a	17,46 a	29,25 b
UFLA11	145,24 a	24,57 a	160,03 a	80,42 a	17,34 a	30,69 b
Test.	151,33 a	17,15 b	175,96 a	89,95 a	17,59 a	38,03 a

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²µg.g⁻¹

TABELA 9: Eficiência de absorção (EA) de micronutrientes de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	Cu ²	Fe	Mn	Zn
UFV17	697,78 a	160079,6 a	4276,41 a	3289,28 a
UFV22	357,57 a	96394,5 b	2706,72 a	1949,65 a
UFV25	549,05 a	148104,7 a	3866,38 a	2741,29 a
UFV26	525,87 a	114862,4 b	3427,58 a	2712,38 a
UFV27	795,75 a	146338,2 a	5227,23 a	3936,35 a
UFV29	716,22 a	161420,9 a	4435,40 a	3700,02 a
UFV49	482,03 a	78078,9 b	3343,30 a	2589,45 a
UFLA06	582,53 a	109447,8 b	4158,72 a	3043,94 a
UFLA08	591,03 a	130944,4 a	4237,11 a	2985,74 a
UFLA11	548,23 a	120739,7 b	4190,05 a	2815,84 a
Test.	625,19 a	171327,7 a	4545,50 a	3336,28 a

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²µg.g⁻¹

TABELA 10: Eficiência de translocação (ET) de macronutrientes de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	N ²	P	K	Ca	Mg	S
UFV17	99,65 a	99,56 a	99,59 a	99,85 a	99,78 a	99,85 a
UFV22	98,56 b	99,47 b	98,65 b	99,40 b	99,17 b	99,48 b
UFV25	99,56 a	99,59 a	99,60 a	99,83 a	99,74 a	99,84 a
UFV26	99,58 a	99,48 a	99,59 a	99,83 a	99,65 a	99,79 a
UFV27	99,69 a	99,69 a	99,78 a	99,92 a	99,82 a	99,88 a
UFV29	99,70 a	99,69 a	99,74 a	99,88 a	99,79 a	99,88 a
UFV49	99,65 a	99,59 a	99,60 a	99,85 a	99,78 a	99,83 a
UFLA06	99,63 a	99,69 a	99,71 a	99,88 a	99,80 a	99,86 a
UFLA08	99,72 a	99,67 a	99,69 a	99,87 a	99,78 a	99,86 a
UFLA11	99,67 a	99,73 a	99,69 a	99,90 a	99,80 a	99,89 a
Test.	99,54 a	99,54 a	99,50 a	99,84 a	99,71 a	99,81 a

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²%

TABELA 11: Eficiência de translocação (ET) de micronutrientes de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	Cu ²	Fe	Mn	Zn
UFV17	99,46 a	94,22 a	99,76 a	99,70 a
UFV22	96,79 b	80,17 b	98,43 b	97,48 b
UFV25	99,27 a	92,75 a	99,71 a	99,58 a
UFV26	99,02 a	92,91 a	99,56 a	99,48 a
UFV27	99,57 a	96,18 a	99,73 a	99,61 a
UFV29	99,53 a	94,68 a	99,71 a	99,66 a
UFV49	99,15 a	93,96 a	99,59 a	99,51 a
UFLA06	99,47 a	95,17 a	99,78 a	99,55 a
UFLA08	99,33 a	95,20 a	99,70 a	99,58 a
UFLA11	99,59 a	95,54 a	99,79 a	99,60 a
Test.	99,12 a	92,28 a	99,64 a	99,29 a

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

²%

utilização do fósforo, em comparação ao que ocorreu com a testemunha sem inoculação.

As maiores EU de N e de P estão associadas à maior produção de matéria seca da parte aérea de plantas de arroz e trigo, respectivamente (Furlani et al., 1986; Abichequer & Bohnen, 1998). Estas informações vêm ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho, em que o isolado UFLA 11-LS, responsável pelas maiores EU de N e de P, obteve incrementos de 66,65% na área foliar e de 40,90% no peso de matéria seca da parte aérea de plantas de tomateiro. Apesar deste isolado não ter proporcionado o maior crescimento das plantas, ele apresentou diferenças significativas quando comparado à testemunha (Tabela 3).

É provável que o comportamento nas plantas tratadas com o isolado UFV-E49 se deva a um efeito de diluição (Malavolta, 1980), uma vez que as plantas responderam com incremento na produção de matéria seca. Quando se realiza a análise química da parte aérea, a mesma quantidade de material seco é pesado para todas as amostras e dele extraem-se os nutrientes. Em plantas de maior porte, os nutrientes encontram-se menos concentrados em maior área, por isso podem ocorrer menores teores de nutrientes em plantas maiores.

A maior EU de S está associada ao maior desenvolvimento do sistema radicular de cafeeiro (Souza, 1999). No entanto, esta informação contrapõe-se aos resultados verificados neste trabalho, pois o sistema radicular de plantas tratadas com o isolado UFLA 11-LS, responsável pela maior eficiência de utilização do mineral, não diferiu significativamente da testemunha. Porém, o isolado UFV-E49, responsável também por uma boa EU de S, apresentou aumentos de 100% e 225% no peso de matéria fresca e seca de raízes de tomateiro, respectivamente (Tabela 3).

Os isolados UFLA 11-LS e UFV-E49 destacaram-se dos demais com as maiores EA de P, um nutriente pouco móvel no solo. Não houve diferença para a

EA de N, K, Mg, Cu, Mn e Zn entre os isolados de bactérias endofíticas e a testemunha. A eficiência de absorção de algumas bactérias endofíticas foi menor que a da testemunha para o Ca, S e Fe (Tabelas 8 e 9). De acordo com estes resultados, supõe-se que o melhor desenvolvimento do sistema radicular de tomateiro promovido pelo isolado UFV-E49 tenha propiciado melhor absorção do fósforo, o qual foi distribuído para os pontos de crescimento das plantas e, posteriormente, utilizado na produção de matéria seca da parte aérea.

A forte afinidade entre o fósforo, o ferro e o manganês faz com que a sua combinação resulte em uma forma inativa do fósforo, diminuindo a sua absorção pelas plantas (Malavolta, 1980). Uma outra hipótese para explicar a maior EA de P aos isolados UFLA 11-LS e UFV-E49 seria atribuir a estes isolados melhoria na relação entre esses minerais, o que favoreceria a absorção do fósforo pelas plantas.

Não houve diferença entre os isolados endofíticos e a testemunha para eficiência de translocação (ET), exceto para o isolado UFV-E22, que apresentou a menor ET de todos os nutrientes (Tabelas 10 e 11).

Neste trabalho, notou-se que os valores de ET foram maiores do que os observados na literatura. Este fato deve-se ao método de introdução dos isolados endofíticos, em que o corte na região do hipocótilo, destituindo as plântulas de suas raízes e aguardando novo enraizamento, formou raízes mais finas, as quais foram responsáveis por altos índices de ET.

5.5 Relação do acúmulo de nutriente entre a parte aérea e as raízes

A relação do acúmulo de nutriente entre parte aérea (PA) e raízes (R) das plantas de tomateiro tratadas com isolados de bactérias endofíticas previamente selecionados para a promoção de crescimento variou em função do nutriente analisado (Tabela 12).

TABELA 12: Relação de acúmulo de nutrientes na parte aérea/raízes (PA/R) de plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas

Isolados	Relação PA/R									
	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
UFV17	0.97 b	0.77 c	0.84 c	2.21 c	1.57 b	2.26 a	0.63 b	0.06 a	1.43 a	1.12 a
UFV22	0.84 b	0.76 c	0.88 c	2.05 c	1.50 b	2.32 a	0.40 b	0.04 a	0.82 b	0.61 b
UFV25	0.84 b	0.91 b	0.93 c	2.16 c	1.44 b	2.35 a	0.59 a	0.05 a	1.32 a	0.89 a
UFV26	1.19 a	0.91 b	1.18 a	2.93 b	1.33 b	2.23 a	0.52 b	0.06 a	1.02 b	0.94 a
UFV27	0.87 b	0.89 b	1.25 a	3.36 a	1.52 b	2.26 a	0.64 a	0.07 a	1.02 b	0.69 b
UFV29	0.97 b	0.91 b	1.08 b	2.37 c	1.32 b	2.34 a	0.60 a	0.05 a	0.98 b	0.83 a
UFV49	1.15 a	0.95 b	1.00 c	2.74 b	1.80 a	2.30 a	0.46 b	0.12 a	0.97 b	0.82 a
UFLA06	0.93 b	1.10 a	1.19 a	2.79 b	1.68 a	2.23 a	0.65 a	0.07 a	1.47 a	0.77 b
UFLA08	1.16 a	0.98 b	1.05 b	2.42 c	1.51 b	2.29 a	0.48 b	0.06 a	1.09 b	0.67 b
UFLA11	0.87 b	1.03 a	0.91 c	2.68 b	1.39 b	2.57 a	0.70 a	0.06 a	1.36 a	0.72 b
Test.	0.93 b	0.92 b	0.85 c	2.62 b	1.47 b	2.26 a	0.47 b	0.05 a	1.18 b	0.60 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

O isolado UFLA 06-LS destacou-se dos demais apresentando a melhor relação PA/R para o P, K, Mg, Cu e Mn. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a relação PA/R de S e Fe (Tabela 12).

Vários mecanismos relacionados às características morfológicas e fisiológicas das plantas contribuem para o uso eficiente de nutrientes, dentre eles a alta relação entre a parte aérea e as raízes. Dessa forma, pode-se ter correlação direta para este atributo, ou seja, quanto maior a relação parte aérea/raízes, maior a eficiência de translocação das plantas (Pozza, 2004).

Analisando-se a relação de silício (Si) entre parte aérea e raiz em mudas de eucalipto, Carvalho et al. (2003) observaram a retenção do mineral nas raízes, pois a relação PA/R começou a reduzir, a partir de 60 dias após o transplante.

indicando diminuição da eficiência de translocação deste nutriente com o avançar da idade das plantas.

De maneira semelhante, Pozza (2004) verificou que a cultivar de café Mundo Novo apresentou maior relação PA/R para N, P, K, Ca, Mg, S, B, Mn e Si, justificando a maior capacidade de translocar esses nutrientes das raízes para a parte aérea.

Dentro deste contexto, observou-se que o isolado UFLA 11-LS, responsável pela maior eficiência de absorção e utilização de P, não foi eficiente em translocar este mineral (Tabela 10). No entanto, a alta relação PA/R explicou a sua distribuição das raízes para os tecidos foliares das plantas (Tabela 12).

O isolado UFV-E22 apresentou a relação PA/R de P e Ca menor que a da testemunha, confirmando os valores obtidos para a ET destes minerais. Para os demais nutrientes, a relação PA/R deste isolado não diferiu da testemunha (Tabela 12).

6 CONCLUSÕES

- 1 O isolado UFV-E49 promoveu o maior crescimento de plantas de tomateiro, propiciando maior altura, área foliar, número de folhas e peso da matéria fresca e seca, tanto da parte aérea quanto da raiz.
- 2 Nenhum dos dez isolados de bactérias endofíticas foi capaz de fixar nitrogênio.
- 3 Os teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu e Zn encontrados na parte aérea e de N, P, Mg e Mn nas raízes das plantas de tomateiro foram influenciados pelas bactérias endofíticas.
- 4 O isolado endofítico UFLA 11-LS propiciou a melhor eficiência de utilização de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe e Zn e o isolado UFV-E49 a melhor eficiência de utilização de Mn.
- 5 A maior eficiência de absorção de P foi obtida pelos isolados UFLA 11-LS e UFV-E49.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.22, p.21-26, 1998.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y. et al. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p.1317-1324, 1989.
- BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Fertilizers Res.**, v.42, p.241-250, 1995.
- BOTTINI, R. et al. Identification of gibberelins A₁, A₃ in culture of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, p.45-47, 1989.
- CARVALHO, R. et al. Absorção e translocação de silício em mudas de eucalipto cultivadas em Latossolo e Cambissolo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p.491-500, 2003.
- CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, Bethesda, v.43, p.99-112, 1997.
- CHANWAY, C.P. **Forest Sciences Department research highlight – Nitrogen fixing pine?** Vancouver: Faculty of Forestry and Faculty Agricultural Sciences, University of British Columbia, 2001. Disponível em:
<<http://www.forestry.ubc.ca/brchline/99dec/fs.htm>>. Acesso em: 18 out. 2001.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, Itaguaí: EMBRAPA/CNPAB, 1995. 60p.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C. Screening crop genotypes for mineral stresses. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESSES. 1993, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln: University of Nebraska, 1993. p.142-159.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows Versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.

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

FURLANI, A.M.C.; BATAGLIA, O.C.; AZZINI, L.E. Comportamento diferencial de linhagens de arroz na absorção e utilização de nitrogênio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, p.51-59, 1986.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.

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

HUREK, T., et al. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.

ISOPI, R. et al. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moebch ssp. *bicolor* with VAM and *A. diazotrophicus*. **Symbiosis**, v.18, p.43-55, 1995.

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

KIJIMA, T. et al. **Process for biologically preventing dicotyledoneous plant diseases using symbiotical bacteria**. USA Patent. No. 5.401.655 (03-28-1995). 1995. 12p.

LALANDE, R. et al. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant growth-promoting potencial. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, p.7-11, 1989.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, Alexandria, v.32, p.188-192, 1997.

LI, B.; MCKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v.37, p.613-626, 1991.

MALAVOLTA, E. **Elementos da nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. revisada e atualizada. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARTINEZ, H.E.P.; CARVALHO, J.G. de; SOUZA, R.B de. **Diagnose Foliar**. In: RIBEIRO A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H.V. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª aproximação**, 1999. p.143-168.

MARTINEZ, H. E. P. et al. Comportamento de variedades de soja cultivadas sob diferentes níveis de fósforo: II. Translocação do fósforo absorvido e eficiência nutricional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.239-244, 1993.

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

POZZA, A.A.A. **Silício em mudas de cafeeiro: efeito na nutrição mineral e na suscetibilidade à cercosporiose em três variedades**. 2004. 83p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H.V. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª aproximação**, 1999. 359p.

SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo.** 2002. 124p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal Plant Nutrition**, New York, v.4, p.289-302, 1981.

SOUZA, R.B. **Níveis críticos de enxofre em solos e em folhas de cultivares de café.** 1999. 88p. Tese (Doutorado em Solos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, G.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal Plant Nutrition**, New York, v.17, p.1687-1699, 1994.

van PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.456-463, 1989.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. Quant - A software for plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003. Christ Church, New Zealand. **Abstracts...** Christ Church, New Zealand, 2003. p.105, Abstract 8.18. I Software.