

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Controle biológico de doenças foliares e murchas do tomateiro
pelo uso rizobactérias**

Dediel Júnior Amaral Rocha

Pelotas, 2012

Dediel Júnior Amaral Rocha

**Controle biológico de doenças foliares e murchas do tomateiro
pelo uso rizobactérias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, da Universidade Federal de Pelotas como requisito à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Fitopatologia).

Orientadora: Dra. Andréa Bittencourt Moura

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

R672c Rocha, Dediel Júnior Amaral

Controle biológico de doenças foliares e murchas do tomateiro pelo uso rizobactérias / Dediel Júnior Amaral Rocha ; orientador Andréa Bittencourt Moura.- Pelotas,2012.-54f. : il. - Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.*Solanum lycopersicum* 2.Biocontrole 3.*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4.*Phytophthora infestans* 5.*Ralstonia solanacearum* 6.*Septoria lycopersici* I.Moura, Andréa Bittencourt(orientador) II .Título.

CDD 635.642

Banca examinadora:

Profa. Dra. Andréa Bittencourt Moura - Orientadora
(Universidade Federal de Pelotas)

Profa. Dra. Danielle Ribeiro Barros
(Universidade Federal de Pelotas)

Dra. Bianca Obes Corrêa
(Universidade Federal de Pelotas)

Profa. Dra. Norimar D'Ávila Denardin
(Universidade de Passo Fundo)

À minha esposa Tanise
que sempre esteve do meu lado
e ao meu filho Igor, Dedico

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, por me capacitar para execução deste trabalho e por colocar na minha vida pessoas importantes que contribuíram direto ou indiretamente para minha formação.

Aos meus pais pela confiança e pela compreensão.

À minha orientadora, desde a iniciação científica, a professora Andréa Moura, pela oportunidade de aprender e evoluir como profissional e pessoa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade – Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao CPACT-EMBRAPA e ao pesquisador Dr. Cesar Bauer por disponibilizar as instalações para condução dos ensaios de campo.

A todos os amigos e colegas que dê alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e me incentivaram durante este período.

Resumo

ROCHA, Dediel Júnior Amaral. **Controle biológico de doenças foliares e murchas do tomateiro pelo uso rizobactérias**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A busca por alternativas no controle de doenças em substituição ao uso intensivo de agrotóxicos tem sido objeto da pesquisa agrícola. Rizobactérias são conhecidas pelo biocontrole de doenças e promoção de crescimento em diversos cultivos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficácia de seis rizobactérias, pré-selecionadas, no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), em casa de vegetação e relacionar este comportamento a produção de compostos “in vitro”, bem como avaliar a proteção de plantas de tomate contra doenças da parte aérea que ocorreram naturalmente em condições de campo. Foi avaliada a capacidade destas rizobactérias em produzir quitinases, amilases, lipases, compostos antibióticos e de solubilizar fosfato. A microbiolização das sementes com a rizobactéria DFs1420 (*Bacillus* sp.) reduziu a severidade da murcha bacteriana em 66% aos 14 dias após a inoculação, no primeiro ensaio e valores de AACPD em 70%, no segundo ensaio. Este controle pode ser associado à produção de compostos responsáveis pela antibiose observada “in vitro”. *Streptomyces* (DFs1296 e DFs1315) e *Bacillus* sp. (DFs1414) reduziram significativamente a murcha de fusário. O controle observado pode ser atribuído à atividade quitinolítica e/ou antibiótica por compostos voláteis. Foram instalados três ensaios de campo. A severidade das doenças foliares foi monitorada ao longo do tempo. As rizobactérias foram capazes de proteger as plantas contra *Septoria lycopersici*. DFs1414 e DFs1421 (*Pseudomonas* sp.) foram as mais estáveis, proporcionando proteção em dois ensaios consecutivos. As rizobactérias DFs1296 e DFs1420 foram capazes de controlar a requeima (*Phytophthora infestans*) em dois ensaios. A bactéria DFs1296 também apresentou capacidade de proteção contra estas e outras doenças quando pulverizada semanalmente na parte aérea. De modo geral, o controle alcançado por estas bactérias, microbiolizadas às sementes ou em aplicação foliar, não diferiu dos tratamentos utilizando produtos químicos recomendados para a cultura em aplicações semanais.

Palavras-chave: Biocontrole, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora infestans*, *Ralstonia solanacearum*, *Septoria lycopersici*, *Solanum lycopersicum*

Abstract

ROCHA, Dediel Júnior Amaral. **Biological control of tomato's foliar and wilt diseases by the use of rhizobacteria**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The search on alternative control of diseases to replace the use of pesticides has been the subject of agricultural research. Rhizobacteria are known by controlling diseases and promoting growth in several crops. The objectives of this work were to evaluate the efficacy of six rhizobacteria pre-selected for the control of *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) in greenhouse, and to relate this behavior with the production of compounds "in vitro", as well as evaluate the protection of tomato plants against foliar diseases under field conditions. It was evaluated the ability of these rhizobacteria to produce chitinases, amylases, lipases, antibiotic compounds and to solubilize phosphate. The seed microbiolization with rhizobacterium DFs1420 (*Bacillus* sp.) reduced the severity of the bacterial wilt 66% at 14 days after inoculation and AUDPC 70%, respectively, the first and second assays. This control may be associated with the production of compounds responsible for the antibiosis observed "in vitro". *Streptomyces* (DFs1296 and DFs1315) and *Bacillus* sp. (DFs1414) significantly reduced fusarium wilt. The control observed can be attributed to the chitinolytic activity and/or antibiosis in the presence of volatile compounds. Three field trials were carried out in field. The foliar diseases severity was monitored over time. The rhizobacteria were capable of protecting plants against *Septoria lycopersici*. DFs1414 and DFs1421 (*Pseudomonas* sp.) were the most stable, providing protection in two consecutive trials. The rhizobacteria DFs1296 and DFs1420 were able to control late blight (*Phytophthora infestans*) in two trials. DFs1296 also had the ability to protect against these and other diseases when sprayed weekly in the plant canopy. In general, the control achieved by these rhizobacteria, by seed microbiolization or by foliar application, did not differ from treatments using recommended chemical in weekly applications.

Keywords: Biocontrol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora infestans*, *Ralstonia solanacearum*, *Septoria lycopersici*, *Solanum lycopersicum*

Lista de tabelas

Tabela 1. Rizobactérias utilizadas como agentes de controle biológico	18
Tabela 2. Atividade enzimática de rizobactérias biocontroladoras de doenças do tomate	23
Tabela 3. Crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na presença de metabolitos voláteis produzidos por rizobactérias	24
Tabela 4. Efeito de rizobactérias e de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a incidência de folhas murchas de tomateiro inoculado com <i>Ralstonia solanacearum</i> e massa seca da parte aérea. (Ensaio 1)	26
Tabela 5. Efeito de rizobactérias e de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a incidência de folhas murchas de tomateiro inoculado com <i>Ralstonia solanacearum</i> e massa seca da parte aérea. (Ensaio 2).....	27
Tabela 6. Severidade da murcha de fusário em plantas de tomate inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e pulverizadas com ASM ou provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, após 28 dias da inoculação.	28
Tabela 7. Rizobactérias utilizadas como agentes de controle biológico	34

Tabela 8. Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias e aplicação foliar de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a severidade de doença (ISD) da septoriose e requeima do tomate, em condições de campo. (Ensaio 1 e 2).....39

Tabela 9. Efeito de rizobactérias sobre progresso de doenças foliares (AACPD) e produção de frutos do tomate em condições de campo. (Ensaio 3).....40

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Lista de tabelas.....	8
1 - Introdução.....	12
2 - CAPÍTULO-1 Rizobactérias no controle de <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em tomate em casa de vegetação.....	15
2.1 - Introdução.....	15
2.2 - Material e métodos.....	18
2.2.1- Microrganismos utilizados.....	18
2.2.2 - Caracterização bacteriana quanto à capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção de crescimento.....	19
2.2.3 - Ensaio em casa de vegetação.....	21
2.2.3.1 Microbiolozação das sementes.....	21
2.2.3.2 - Inoculação e avaliação de <i>Ralstonia solanacearum</i>	21
2.2.3.3 - Inoculação e avaliação FOL.....	22
2.2.4 - Procedimento estatístico.....	23
2.3 - Resultados e discussão.....	23
2.4 – Conclusões.....	31
3 - CAPÍTULO 2 Rizobactérias no controle de doenças foliares do tomate em condições de campo.....	32
3.1 - Introdução.....	32

3.2 - Material e métodos.....	34
3.2.1 – Microrganismos utilizados.....	34
3.2.2 - Microbiolização das sementes.....	34
3.2.3 – Ensaio em campo.....	35
3.2.4 - Avaliações.....	36
3.2.5 - Procedimento estatístico.....	37
3.3 - Resultados e discussão.....	37
3.4 – Conclusões.....	43
4 – Conclusão.....	44
5 - Referências.....	45

1 - Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça amplamente cultivada no Brasil e outros países. A espécie tem seu centro de origem nas Américas, especificamente na área limitada ao norte pelo Equador, ao sul pelo Chile, a oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes. O tomate foi levado para o México (centro secundário de origem), onde passou a ser cultivado e melhorado. Foi então, introduzido na Europa no século XVI pelos espanhóis, sendo inicialmente considerada planta ornamental. Os frutos de tomate tiveram seu uso culinário retardado, por temor de toxicidade, já que muitas solanáceas conhecidas na época eram venenosas (FILGUEIRA, 2003).

No Brasil, o tomate foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX, tornando-se uma das hortaliças mais cultivadas no país (ALVARENGA, 2004). O tomate é uma hortaliça muito popular na gastronomia brasileira, “in natura” ou como derivados, é bastante apreciado no país pelo seu sabor, como também pela grande concentração de substâncias benéficas, entre elas o licopeno, que está associado à prevenção de doenças (PALOZZA et al., 2011).

O tomate é cultivado comercialmente na maioria dos estados brasileiros. Em 2010, a soma da produção brasileira de tomate industrial e de mesa foi de 4.114.312 toneladas, com cerca de 68 mil ha plantados. Para o ano de 2011, a estimativa é de 4.085.912 toneladas a serem colhidas em uma área plantada de 65.312 ha, com uma produtividade média de 62,56 ton.ha⁻¹ (IBGE, 2011). A região Sudeste é a maior produtora com área de 22.705 ha e uma produção de 1.5 milhões toneladas. O Rio Grande do Sul possui uma área de 2.385 ha e produção de 108.863 toneladas, sendo Caxias do Sul, Pelotas e Farroupilha os principais municípios produtores do estado (IBGE, 2011).

A cultura do tomate está sujeita ao ataque de várias doenças que podem limitar sua produção. Cerca de 200 doenças são conhecidas afetando a tomaticultura em todo mundo (LOPES; ÁVILA, 2005).

O controle de muitas doenças do tomate tem sido realizado quase que exclusivamente com base na aplicação de produtos químicos. Vários agrotóxicos têm sido recomendados para a cultura, porém, estes não são considerados soluções de longo prazo, devido às preocupações da sociedade com os riscos para saúde e o ambiente (TILMAN et al., 2001).

O uso de cultivares com resistência genética a doenças, quando disponível, é uma das formas mais eficaz para controle de doenças, porém, muitas vezes, a obtenção de variedades resistentes é limitada, devido à dificuldade de se achar boas fontes de resistência às diferentes variantes dos patógenos que atacam as culturas (ST CLAIR, 2010).

O desenvolvimento de novos produtos para controle vem sendo estimulado, entre os quais destacam-se os biológicos. O controle biológico é uma alternativa que vem mostrando potencial no controle de vários patógenos de solo e parte aérea na cultura do tomate (HAAS; DÉFAGO, 2005; MAKSIMOV; ABIZGIL'DINA; PUSENKOVA, 2011). O biocontrole pelo uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR, do inglês plant growth promoting rhizobacteria) representa uma alternativa potencial como um dos componentes do manejo integrado de doenças, pois estas são conhecidas por promover o crescimento de plantas e reduzir a intensidade de doenças em diversas culturas (KLOEPPER et al., 1980; JETIYANON; KLOEPPER, 2002).

A redução de doenças pela colonização das raízes por rizobactérias pode ocorrer diretamente, através de competição por espaço, nutrientes e nicho ecológico ou pela produção de substâncias antimicrobianas e indiretamente, através da indução de resistência sistêmica (ISR) (KLOEPPER; BEAUCHAMP, 1992; LIU; KLOEPPER; TUZUN, 1995).

Entre as rizobactérias, *Pseudomonas* spp. têm sido relatadas como eficaz contra um amplo espectro de patógenos de plantas, incluindo fungos, bactérias e vírus em várias espécies de plantas, como por exemplo, feijão, cravo, pepino, rabanete, tomate, fumo e *Arabidopsis thaliana* (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Da mesma forma, bactérias esporulantes Gram-positivas, como *Bacillus* spp. e

Streptomyces spp. também têm sido utilizadas com sucesso para o controle de doenças de plantas (KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004; BOUKAEW; CHUENCHIT; PETCHARAT, 2011).

Os mecanismos pelos quais as rizobactérias podem atuar são o antagonismo direto pela produção de substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutrientes, o parasitismo, ou através da indução de resistência sistêmica (ISR) (KLOEPPER; BEAUCHAMP, 1992; LIU; KLOEPPER; TUZUN, 1995). A indução de resistência é a ativação dos mecanismos de defesa da planta em resposta a estímulos de agentes indutores que podem ser bióticos ou abióticos (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

O presente estudo, portanto, teve como objetivos avaliar a eficácia de seis rizobactérias pré-selecionadas para controle da mancha bacteriana e oídio (NAUE, 2009) no controle da murcha bacteriana e murcha de fusário em casa de vegetação, bem como avaliar a proteção de plantas de tomate contra doenças da parte aérea em condições de campo.

2 – CAPÍTULO 1 Rizobactérias no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate em casa de vegetação

2.1 - Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça em importância econômica no Brasil, sendo superada apenas pela batata. A produção nacional de tomate tem aumentado nos últimos anos, resultado do aumento da demanda, impulsionada pela grande variedade de produtos industriais derivados deste e das suas vantagens nutricionais.

Diversas doenças afetam a cultura do tomate, sendo que as de etiologia bacteriana têm causado grandes prejuízos. Dentre estas, a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. tem promovido elevadas perdas em culturas instaladas nas diversas regiões brasileiras. Dependendo das condições ambientais, os prejuízos podem ser totais (SILVEIRA; MARIANO; MICHEREFF, 1996).

R. solanacearum possui uma ampla gama de hospedeiros, na qual estão centenas de espécies de plantas pertencentes a 44 famílias botânicas (HAYWARD, 1991). *R. solanacearum* é capaz de sobreviver no solo por vários anos, associada aos restos de cultura e à rizosfera de plantas. Por apresentar uma fase saprofítica em seu ciclo de vida, a bactéria aumenta suas possibilidades de sobrevivência no solo, mesmo na ausência de hospedeiros (HAYWARD, 1991).

A grande variabilidade genética, apresentada por *R. solanacearum*, levou ao amplo uso de dois sistemas de classificação ao nível subespecífico: raças,

baseados em diferenças na gama de espécies hospedeiras (HE, SEQUEIRA; KELMAN, 1983) e biovars, baseado na capacidade de utilização ou oxidação de diferentes fontes de carbono (HAYWARD, 1994a, b). Recentemente, estudo baseado na análise de sequência genética de determinadas regiões do genoma propôs sua separação em filotipos, e estes, em sequevares (FEGAN; PRIOR, 2005).

Outra doença de importância econômica na cultura do tomate é a murcha de fusário causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder e Hansen (FOL) (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Os sintomas típicos são: amarelecimento das folhas, geralmente a partir das mais velhas, queda prematura dos frutos e murcha nas horas mais quentes do dia até que se torne irreversível. Uma vez introduzido em áreas de cultivo, este patógeno pode permanecer viável durante anos devido à sua capacidade de produzir estruturas de resistência (clamidósporos) (AGRIOS, 2005).

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* é agrupado em três raças fisiológicas, conforme sua habilidade de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras contendo diferentes loci de resistência. No Brasil, as raças 1 e 2 encontram-se amplamente distribuídas, enquanto a raça 3 já foi relatada em regiões mais restritas, afetando cultivos comerciais nos estados do Espírito Santo (REIS et al., 2005) e Rio de Janeiro (REIS; BOITEUX, 2007).

Em áreas já cultivadas há muito tempo (monocultivos) é comum a destruição total das plantas ou a redução drástica da colheita devido à morte prematura das plantas (LOPES; ÁVILA, 2005). No Rio Grande do Sul, em levantamentos realizados em áreas de plantio de tomateiro, foi constatada a prevalência da murcha de fusário em 25% das regiões avaliadas, com incidência média de 8,4% (BLUME; JARA, 2004).

Nenhuma medida de controle químico é efetiva e economicamente viável no controle da murcha de fusário ou *R. solanacearum* em tomateiro (LOPES; ÁVILA, 2005). Nas áreas onde estes patógenos ainda não ocorrem, o manejo pelo princípio da exclusão, visando o impedimento da entrada do patógeno na área de cultivo, é o mais importante. Em áreas onde *Fusarium* já se encontra estabelecido, um dos métodos mais eficazes de redução de perdas é o controle genético, através do plantio de cultivares resistentes (REIS et al., 2005). Apesar de existirem cultivares e híbridos comerciais de tomate resistentes à murcha de fusário, estes apresentam geralmente resistência às raças fisiológicas 1 e 2 do patógeno. Contudo, cultivares

comerciais que demonstram resistência a raça fisiológica 3 ainda não estão disponíveis no Brasil (REIS et al., 2005).

A obtenção de variedades resistentes a *R. solanacearum* é bastante difícil, devido à dificuldade de se achar boas fontes de resistência às diferentes variantes da bactéria. Além do mais, a resistência do tomate à murcha bacteriana é do tipo poligênica e pode sofrer interferência do ambiente ou trazer consigo características agrônômicas indesejáveis (LOPES; ÁVILA, 2005).

O controle biológico com o uso de rizobactérias promotoras do crescimento (PGPR) pode ser uma alternativa para o manejo de patógenos habitantes do solo, considerados de difícil controle (HANDELSMAN; STABB, 1996; THANH, et al., 2009). As rizobactérias são conhecidas por promover o crescimento de plantas, bem como diminuição da quantidade de doenças em diversas culturas (VAN LOON, 1998; WHIPPS, 2001).

A redução de doenças pela colonização das raízes das plantas por rizobactérias pode ocorrer diretamente, através de competição por espaço, nutrientes e nicho ecológico ou pela produção de substâncias antimicrobianas ou ainda indiretamente, através da indução de resistência sistêmica (ISR) (KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004; HAAS; DÉFAGO, 2005).

Avaliações de rizobactérias têm sido realizadas com sucesso contra a murcha de fusário em tomate, tanto em casa de vegetação, como em condições de campo (RAMAMOORTHY; RAGUCHANDER; SAMIYAPPAN, 2002; SON et al., 2009; SHANMUGAM; KANOUIA, 2011). Trabalhos também têm sido conduzidos na tentativa de controle da murcha bacteriana pela aplicação de rizobactérias antagonistas (MOURA; ROMEIRO; NEVES, 1998; ANITH; MOMOL, 2004; GUO et al., 2004; LEMESSA; ZELLER, 2007; VANITHA et al., 2009).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da microbiolização de sementes de tomate com seis rizobactérias selecionadas para controle da mancha bacteriana e oídio (NAUE, 2009) no controle de *R. solanacearum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em casa de vegetação, bem como a caracterização parcial destas rizobactérias.

2.2 - Material e métodos

2.2.1- Microrganismos utilizados

As rizobactérias utilizadas (Tabela 1) foram isoladas do solo e selecionadas como antagonista contra *R. solanacearum* (MOURA; ROMEIRO; NEVES, 1998), *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic) Jones et. al. e oídio, *Oidium* sp. (NAUE, 2009) e como promotores de crescimento (DEUNER, 2004) em condições de casa de vegetação. Estas bactérias fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas.

Tabela 1. Rizobactérias utilizadas como agentes de controle biológico.

Isolados	Gêneros	Nicho de isolamento
DFs1296	<i>Streptomyces</i> (Waksman; Henrici)	Solo sob cultivo de gramíneas
DFs1315	<i>Streptomyces</i> (Waksman; Henrici)	Solo sob cultivo de citros
DFs1414	<i>Bacillus</i> (Cohn)	Solo de rizosfera de tomate
DFs1420	<i>Bacillus</i> (Cohn)	Solo de rizosfera de tomate
DFs1421	<i>Pseudomonas</i> (Migula)	Solo de rizosfera de tomate
DFs1423	<i>Bacillus</i> (Cohn)	Solo de rizosfera de tomate

R. solanacearum, isolado DFs-RS01, foi obtido de plantas de tomate com sintomas severos de murcha, provenientes do município Pelotas-RS. O isolamento foi realizado em meio de tetrazólio (KELMAN, 1954) e a preservação feita em tubos contendo água estéril.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*, isolado UFV-FOL01 foi cedido pelo Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da Universidade Federal de Viçosa.

Testes de patogenicidade para ambos os patógenos foram realizados através da inoculação de plantas de tomate em casa de vegetação e re-isolamento dos mesmos.

2.2.2 - Caracterização bacteriana quanto à capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção de crescimento

Solubilização de fosfato: as rizobactérias foram repicadas, em pontos distribuídos em placa de Petri contendo meio de cultura com TSA 1/10 acrescido de solução de fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte de fosfato (adaptado de MARIANO; SILVEIRA, 2005). Aos sete dias de incubação a 28 °C foi avaliado a presença de halo formado em volta da colônia de cada rizobactéria. A formação de halo foi considerada um indicativo da solubilização de fosfato pela bactéria no meio em estudo.

Produção de quitinases: utilizou-se meio mineral Renwick; Campbell; Coe (1991), em que quitina (Sigma) coloidal 0,08% foi a única fonte de carbono. Posteriormente, as rizobactérias foram semeadas em pontos distintos da superfície do meio e incubadas a 28 °C durante 14 dias. Após o período de incubação, a produção de quitinases foi constatada pela observação de um halo transparente ao redor da colônia (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Produção de amilases: repicaram-se as rizobactérias em pontos distribuídos na placa de Petri em meio Agar amido. As placas foram incubadas a 28 °C por cinco dias. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 5 mL de uma solução de iodo (Lugol) sobre a placa de Petri. A presença de um halo incolor em torno das colônias indicou a produção de amilases (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Produção de lipases: foi avaliada através da repicagem das bactérias para placa de Petri contendo meio de cultura de Tween 80. As placas foram incubadas a 28 °C por cinco dias. A presença de um precipitado ao redor das colônias indicou a capacidades das bactérias hidrolisarem lipídios (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Antibiose “in vitro” de rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum*: as rizobactérias foram repicadas em placas de Petri contendo uma fina camada de meio de 523 sólido (KADO; HESKETT, 1970), em forma de uma linha larga no

centro de cada placa. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas e posteriormente as colônias crescidas sobre o meio foram removidas com algodão.

A seguir, em câmara de fluxo laminar, as placas foram dispostas com a tampa para baixo e receberam cada uma 2 mL de clorofórmio na tampa, para assegurar completa eliminação de todas as colônias viáveis. Após evaporação do clorofórmio foi vertida uma sobrecamada de meio 523 semissólido fundente acrescida de 100 µL, para 100 mL de meio, da suspensão de *R. solanacearum*, previamente cultivada em meio 523 líquido por 72 h. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. A testemunha constitui-se de placas submetidas ao mesmo procedimento, exceto pela repicagem das rizobactérias. A antibiose foi determinada pela observação da formação de halo de inibição do crescimento de *R. solanacearum*.

Antibiose contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) por compostos não voláteis: as rizobactérias foram repicadas para placas de Petri contendo meio batata dextrose agar (BDA) e incubados como descrito no item anterior.

Discos de cultura, de aproximadamente 10 mm de diâmetro de FOL previamente crescidos em meio BDA foram repicados para as placas contendo as rizobactérias. Como testemunhas foram utilizadas placas com BDA e discos de micélio apenas.

Após incubação a 28 °C por sete dias, a antibiose foi determinada pela redução do crescimento do micélio do patógeno.

Antibiose contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) por compostos voláteis: foram utilizadas placas de Petri com 85 mm de diâmetro, divididas em dois compartimentos. Um dos compartimentos foi preenchido com meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e semeadas as rizobactérias, no outro compartimento foi adicionado o meio BDA, onde se depositou um disco de micélio de FOL com 10 mm de diâmetro. Como testemunhas, foram utilizadas placas contendo somente disco de micélio de FOL em meio BDA, em um dos compartimentos e apenas meio 523 no outro compartimento. Após o seu preparo, as placas foram fechadas com Parafilm® e mantidas em sala de incubação a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. O crescimento micelial de FOL foi avaliado após sete dias, pela medição do diâmetro da colônia.

Cada tratamento constituiu-se de três repetições em um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada placa considerada uma unidade experimental.

2.2.3 - Ensaio em casa de vegetação

2.2.3.1 Microbiolização das sementes

Sementes de tomate cv. Super Marmande foram imersas durante 4 h sob agitação e temperatura de 4 °C, em suspensão salina (0,85% NaCl) de cada rizobactéria com 24 h de crescimento em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para $A_{540} = 0,5$, correspondente à aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL⁻¹). A testemunha constituiu-se de sementes imersas em solução salina.

Foram realizados dois ensaios para cada patógeno, a fim de avaliar o controle de *R. solanacearum* ou *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em casa de vegetação. O primeiro ensaio para *R. solanacearum* foi conduzido nos meses de fevereiro a março e o segundo, nos meses março a abril de 2011. Para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, o primeiro ensaio foi de maio a junho e o segundo, nos meses de setembro a novembro, ambos em 2011.

Os tratamentos constituíram da microbiolização das sementes com cada uma das rizobactérias; e pulverização semanal com indutor abiótico acibenzolar-S-metil (produto comercial BION[®]) na dosagem de 0,05 g.L⁻¹. Como controle foi utilizado solução salina nas sementes.

Sementes de tomate microbiolizadas com as rizobactérias, ou com solução salina apenas, foram semeadas em copos plásticos de 700 mL, contendo substrato agrícola Carolina[®] não esterilizado. Após a completa germinação, as plântulas foram desbastadas deixando-se uma plântula por copo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e uma planta por parcela.

2.2.3.2 - Inoculação e avaliação de *Ralstonia solanacearum*

O isolado de *R. solanacearum* foi repicado para placas de Petri contendo meio de tetrazólio (KELMAN, 1954) e incubado por 48 h a 28 °C. Após o crescimento das colônias foram preparadas as suspensões bacterianas em solução salina (0,85%) ajustando a concentração para 10^8 ufc.mL⁻¹ ($A_{540} = 0,5$).

Aos 30 dias após a semeadura foi realizada a inoculação de *R. solanacearum*. A inoculação foi realizada através de ferimentos das raízes pela inserção de uma

faça no substrato na direção das mesmas, seguida da rega do substrato com 5 mL, por planta, da suspensão do isolado RS-01. Uma testemunha não inoculada foi mantida para avaliação da alteração de matéria seca em relação às plantas inoculadas com patógeno.

O tratamento com aplicação foliar de acibenzolar-S-metil (Bion[®] 0,05 g.L⁻¹) foi iniciado 24 h antes da inoculação do patógeno e repetida em intervalos de sete dias.

As avaliações foram realizadas após o aparecimento dos primeiros sintomas, sendo no primeiro ensaio aos 8, 10, 12 e 14 dias após a inoculação e no segundo, aos 12, 14, 16 e 18 dias após a inoculação, determinando se a porcentagem de folhas murchas (número de folhas murchas x 100/número total de folhas da planta) (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007).

Após as avaliações quanto à murcha, as plantas foram cortadas rente ao substrato, colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60 °C até atingir peso constante, para determinação do peso da matéria seca.

2.2.3.3 - Inoculação e avaliação de FOL

Para produção de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, o fungo foi cultivado em meio BDA por dez dias em placas de Petri. A suspensão de conídios foi preparada pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa. Concentração da suspensão de esporos foi ajustada para 10⁴ conídios/mL

As inoculações de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram realizadas aos 30 dias após a semeadura através do método de ferimento das raízes como descrito no item anterior, seguida da rega do substrato com 5 mL, por planta, da suspensão de esporos. O tratamento com aplicação foliar de acibenzolar-S-metil (Bion[®] 0,05 g.L⁻¹) foi iniciado 24 h antes da inoculação do patógeno e repetido em intervalos de sete dias. A avaliação foi feita aos 28 dias após a inoculação pelo uso de escala descritiva de notas de sintomas de murcha de 0 a 4 (SHANMUGAM; KANOUIA, 2011), onde: 0= plantas sem sintomas de murcha; 1= < 25% de sintomas de murcha; 2= 26-50% de sintomas de murcha; 3= 51-75% de sintomas de murcha; 4= 76-100% de sintomas de murcha.

2.2.4 - Procedimento estatístico

Os valores de severidade de *R. solanacearum* foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando o programa desenvolvido por Maffia (1995). Os valores de notas de sintomas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

2.3 - Resultados e discussão

As rizobactérias mostraram atividade para as diferentes enzimas avaliadas. Para o teste de quitinases, as rizobactérias DFs1296, DFs1315 e DFs1420 foram positivas, sendo que as duas primeiras foram positivas tanto para teste de quitinases, como de amilases e lipases (Tabela 2). Apenas DFs1423 apresentou resultado positivo para o teste de solubilização de fosfato de cálcio inorgânico, resultando em halo de solubilização em volta da colônia bacteriana. Em relação à atividade lipolítica, somente dois isolados (DFs1414 e DFs1420) não mostraram atividade positiva (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade enzimática de rizobactérias biocontroladoras de doenças do tomate.

Isolado	Quitinases	Solubilização de fosfato	Amilases	Lipases
DFs1296	+	-	+	+
DFs1315	+	-	+	+
DFs1414	-	-	+	-
DFs1420.	+	-	-	-
DFs1421	-	-	-	+
DFs1423	-	+	-	+

¹(+)= presença de halo; (-)= ausência de halo

As rizobactérias apresentaram comportamento variado quanto à capacidade para inibir o crescimento de *R. solanacearum* “in vitro”, sendo que dois destes isolados, DFs1414 e DFs1420 se destacaram por apresentar os maiores halos de inibição de *R. solanacearum* (Figura 1).

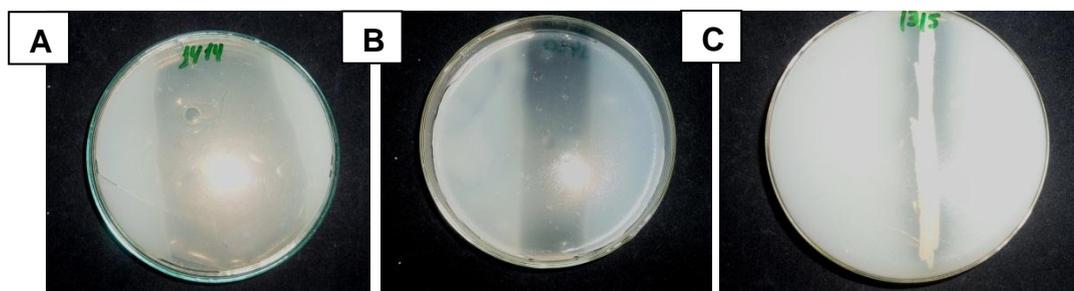


Figura 1. Antibiose de rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum*, DFs1414 (A), DFs1420 (B), DFs1315 (C).

Não foi observada inibição do crescimento micelial de FOL através de compostos não voláteis, pelo teste de pareamento de culturas. Porém, quando avaliou se o efeito de compostos voláteis, produzidos pelas rizobactérias, houve redução significativa do crescimento micelial de FOL. A rizobactéria que apresentou maior percentual de redução de FOL foi DFs1315, seguido de DFs1423, com redução do crescimento micelial de 18,13 e 17,49%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na presença de metabolitos voláteis produzidos por rizobactérias.

Tratamento	Diâmetro micelial (mm)	% de inibição
Testemunha	41,75a ¹	0,0
DFs1421	39,17b	6,18 ²
DFs1296	37,52c	10,13
DFs1414	37,23c	10,82
DFs1420	36,96c	11,47
DFs1423	34,45d	17,49
DFs1315	34,18d	18,13
CV (%)	2,41	

¹Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo de acordo com teste de de Scott-Knott ($p=0,05$) ²Percentual de inibição considerando a testemunha zero de inibição.

No primeiro ensaio em casa de vegetação, visando o controle de *R. solanacearum*, a rizobactéria DFs1420 e o indutor químico acibenzolar-S-metil (ASM) proporcionaram menores porcentagens de folhas murchas, ao final do período, quando a testemunha apresentava 95,5% de incidência (Tabela 4). Aos 14 dias após a inoculação, os tratamentos com DFs1420 e ASM reduziram a severidade da murcha bacteriana em 66% e 54%, respectivamente, em relação à testemunha tratada com solução salina e inoculada com a bactéria. Porém, apesar destes tratamentos terem apresentado uma menor incidência final de folhas murchas, não houve diferença significativa em relação aos valores de AACPD.

Quanto ao efeito dos tratamentos sobre a matéria seca, apenas a testemunha não inoculada com o patógeno apresentou maior massa seca, não sendo observada diferença significativa entre a testemunha inoculada e os demais tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito de rizobactérias e de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a incidência de folhas murchas de tomateiro inoculado com *Ralstonia solanacearum* e massa seca da parte aérea. (Ensaio 1)

Tratamento	Folhas murchas (%)				AACPD	Massa seca (g)
	dias após inoculação					
	8	10	12	14		
Salina ¹	-	-	-	-	-	1,58a
Salina ²	4,76 ^{N.S}	19,05 ^{N.S}	26,59 ^{N.S}	95,5a	187,5b	0,86b
DFs1296	0,00	47,22	72,78	81,00a	343,3a	0,74b
DFs1315	22,22	26,98	64,60	70,5a	259,4a	0,77b
DFs1414	5,56	23,81	52,08	59,5a	222,2b	0,97b
DFs1420	10,71	3,33	13,33	15,5b	48,9b	0,84b
DFs1421	0,00	2,78	27,14	61,00a	118,7b	0,63b
DFs1423	41,98	78,05	81,19	87,16a	441,8a	0,41b
ASM ⁴	0,00	2,78	16,67	24,16b	63,18b	0,84b
CV (%)	144	120	74	51	71	47

¹Testemunha sem patógeno; ²Testemunha com patógeno; ³Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p=0,05$);

⁴Acibenzolar-S-metil, produto comercial Bion 500 WG[®] 0,05 g.L⁻¹

AACPD: área abaixo da curva do progresso da doença

N.S: não significativo

CV: coeficiente de variação

O segundo ensaio mostrou que as rizobactérias DFs1421 e DFs1423 e indutor químico ASM, além de proporcionarem menores porcentagens de folhas murcha aos 18 dias após a inoculação, apresentaram também menores valores de AACPD. O tratamento com rizobactéria DFs1420 também apresentou menor valor de AACPD, apesar de não ter mostrado menor incidência de folhas murchas aos 18 dias. As rizobactérias DFs1421, DFs1423 e DFs1420 reduziram a murcha bacteriana em 92%, 78% e 70%, respectivamente. Não houve diferenças significativas dos valores de massa seca das plantas de tomate, em relação à testemunha não inoculada e os demais tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito de rizobactérias e de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a incidência de folhas murchas de tomateiro inoculado com *Ralstonia solanacearum* e massa seca da parte aérea. (Ensaio 2)

Tratamento	Folhas murchas (%) dias após a inoculação				AACPD	Massa seca (g)
	12	14	16	18		
Salina ¹	-	-	-	-	-	1,99a
Salina ²	44,84 ^{N.S}	56,28 ^{N.S}	56,28 ^{N.S}	56,28a	326,34a	1,14a
DFs1296	62,94	65,18	79,02	82,58a	433,93a	0,94a
DFs1315	31,55	60,71	57,14	78,56a	345,83a	0,77a
DFs1414	10,42	47,91	33,33	57,30a	230,20a	1,15a
DFs1420	9,02	14,02	8,40	47,56 a	101,45b	1,07a
DFs1421	0,00	0,00	3,57	16,51b	23,67b	0,82a
DFs1423	0,00	9,37	15,27	21,87b	71,18b	1,64a
ASM ⁴	0,00	0,00	3,13	18,05b	24,31b	1,01a
CV (%)	131	78	80	46	72	48

¹Testemunha sem patógeno; ²Testemunha com patógeno; ³Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p = 0,05$);

⁴Acibenzolar-S-metil, produto comercial Bion 500 WG[®] 0,05 g.L⁻¹

AACPD: área abaixo da curva do progresso da doença

N.S: não significativo

CV: coeficiente de variação

As rizobactérias DFs1296 , DFs1315 e DFs1414, bem como pulverizações com o ASM proporcionaram reduções significativas da severidade da murcha de fusário, tanto no primeiro, como no segundo ensaio (Tabela 6). Os demais tratamentos não foram eficientes em reduzir a severidade da doença.

Tabela 6. Severidade da murcha de fusário em plantas de tomate inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e pulverizadas com ASM ou provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias, após 28 dias da inoculação.

Tratamento	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Severidade ¹	% de controle	Severidade	% de controle
Salina	2,12a ²	0	2,06a	0
DFs1296	1,31c	38	1,49b	28
DFs1315	1,40c	34	1,49b	28
DFs1414	1,93b	9	1,09c	47
DFs1420	2,06a	3	1,79a	13
DFs1421	2,06a	3	1,86a	9
DFs1423	2,12a	0	2,0a	3
ASM ³	1,79b	15	1,22c	41
C.V. (%)	8,31		11,58	

¹Severidade de murcha conforme escala de notas de 1 a 4, onde: 0= sem sintomas de murcha; 1= < 25% de sintomas de murcha; 2= 26-50% de sintomas de murcha; 3= 51-75 de sintomas de murcha; 4= 76-100 de sintomas de murcha; ²Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo teste de agrupamento de Scott-Knott (p = 0,05); ³Acibenzolar-S-metil, produto comercial Bion 500 WG[®] 0,05 g.L⁻¹

CV: coeficiente de variação

Embora as rizobactérias tenham mostrado certa diversidade quanto à produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou à promoção de crescimento, a capacidade de hidrolisar quitina é considerada estratégica, pois este é o principal composto da parede celular de fungos e nematóides (AGRIOS, 2005). Enzimas quitinolíticas produzidas por rizobactérias têm sido relacionados ao controle biológico de várias doenças fúngicas (AJIT; VERMA; SHANMUGAM, 2006; KISHORE; PANDE, 2007; HARIPRASAD; DIVAKARA; NIRANJANA, 2011).

Por outro lado, a habilidade de produzir outras enzimas pode ser correlacionada à capacidade competitiva das bactérias que a possuem (WHIPPS, 2001). Adicionalmente, as enzimas aqui avaliadas podem apresentar interesse direto em relação ao biocontrole, como as lipases. A ocorrência concomitante de *Fusarium* spp. e espécies do nematóide *Meloidogyne* causam danos mais severos e tornam seu controle mais difícil do que quando estes patógenos ocorrem isoladamente (SIDDIQUI et al., 2000; SON et al., 2009). Considerando que a produção de enzimas lipolíticas por rizobactérias podem exaurir reservas lipídicas de ovos e de juvenis de nematoides, e que a sobrevivência destes depende do acúmulo de lipídios (WRIGHT; PERRY, 2006), a capacidade lipolítica das rizobactérias pode ser importante para o controle da nematose e ou do complexo nematoide-*Fusarium*.

A detecção de antibiose “in vitro” é um método que tem sido usado para seleção inicial de rizobactérias agentes de biocontrole contra *R. solanacearum* (MOURA; ROMEIRO, 1999; LEMESSA; ZELLER, 2007; MESSIHA et al, 2007.; XUE et al., 2009). No presente estudo, apenas DFs1296 não resultou em de zona de inibição “in vitro” de *R. solanacearum*. No entanto, quando estudada por Moura e Romeiro (1999) e denominada de BF110, esta rizobactéria apresentou antibiose contra 15% dos 52 isolados de *R. solanacearum* classificados como diferentes raças/biovars e oriundos de diferentes hospedeiros, coletados em diversas regiões do Brasil e do mundo. Esta discrepância pode residir no fato de se ter utilizado uma metodologia um pouco diferente no presente trabalho. Mariano (1993) em sua revisão sobre métodos de seleção “in vitro” ressalta que diferentes metodologias e suas variantes, podem resultar em alteração da sensibilidade do ensaio, e, portanto, do resultado obtido.

Compostos não voláteis produzidos pelas rizobactérias não foram capazes de inibir o crescimento micelial de FOL. Este comportamento também foi observado por Deuner (2004) avaliando FOL, isolado UFV 0044, embora Naue (2009) tenha verificado antibiose pelas rizobactérias DFs1421 e DFs1423 contra um isolado de FOL diferente do utilizado no presente trabalho. Entretanto, quando se avaliou a produção compostos voláteis, todas as rizobactérias utilizadas no presente trabalho foram capazes de reduzir o crescimento micelial de FOL, embora em diferentes intensidades. Estes resultados são contraditórios em relação aos obtidos por Naue (2009), que não detectou atividade antifúngica das mesmas bactérias em relação a

outro isolado de FOL. O comportamento distinto observado nos diferentes trabalhos, utilizando as mesmas rizobactérias pode estar associado a várias interações de ambiente e uso de isolados diferentes do patógeno desafiador.

A microbiolização das sementes com as rizobactérias DFs1420, DFs1421 e DFs1423 reduziram significativamente a severidade da murcha bacteriana do tomate em condições de casa de vegetação, porém, a rizobactéria DFs1420 foi estável em ambos os ensaios. A utilização de rizobactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* como agentes de biocontrole tem mostrado resultados positivos no manejo da murcha bacteriana (ANITH; MOMOL, 2004; VANITHA et al., 2009; WEI et al., 2011). Estes agentes de biocontrole podem agir principalmente, por antagonismo direto contra *R. solanacearum* ou indução de resistência sistêmica como mostrado em trabalhos conduzidos para identificação do modo de ação de rizobactérias (KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004; HAAS; DÉFAGO, 2005). *R. solanacearum* é um patógeno habitante do solo e a efetiva colonização do sistema radicular por agentes de biocontrole pode prevenir a ataque do patógeno no sitio de infecção e posterior invasão do sistema vascular (NGUYEN; RANAMUKHAARACHCHI, 2010). Portanto, a atividade antagonista apresentada “in vitro” pelo isolado DFs1420 pode ter um papel importante na redução da murcha bacteriana.

As rizobactérias DFs1296, DFs1315 e DFs1414 reduziram significativamente a murcha de fusário em casa de vegetação, em ambos os ensaios. Rizobactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* agentes de biocontrole são importantes habitantes da população da rizosfera e são muito eficazes em reduzir a intensidade de doenças, principalmente podridões de raiz e murchas vasculares (WHIPPS, 2001). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de outros pesquisadores, em que uso de rizobactérias Gram positivas foram eficientes em reduzir a murcha de fusário (SOARES; SOUSA; GARRIDO, 2009; SON et al., 2009; SHANMUGAM; KANOUIA, 2011).

Rizobactérias podem estimular os mecanismos de defesa das plantas (RAMAMOORTHY et al., 2002) ou ter ação direta contra FOL (CHANDEL et al., 2010). Pesquisadores reconhecem que a produção de quitinases é mecanismo importante na inibição de FOL (HARIPRASAD; DIVAKARA; NIRANJANA, 2011). No presente estudo, os isolados DFs1296 e DFs1315 apresentaram atividade quitinolítica e esta pode estar associada à diminuição dos sintomas de murcha de

fusário nos ensaios “in vivo”. Por outro lado, compostos voláteis produzidos por rizobactérias podem atravessar a parede da célula fúngica e induzir alterações na permeabilidade da membrana plasmática (LI et al., 2011). Portanto, a antibiose mediada por estes compostos, observada para todas as rizobactérias aqui estudadas pode também ter contribuído para redução da intensidade da murcha de fusário.

Os níveis de controle alcançados pelas rizobactérias para ambas as murchas foram iguais aos proporcionados pelo indutor de resistência ASM, relatado como eficiente na redução destas doenças (ANITH; MOMOL, 2004; GURGEL et al., 2005).

Embora o controle *R. solanacearum* possa estar relacionado à antibiose e o de FOL à antibiose e à atividade quitinolíticas das rizobactérias aqui estudadas, não se descarta a possibilidade do envolvimento de indução de resistência. Esta ideia ganha força no fato de que a proteção conferida por estas rizobactérias não é específica, uma vez que as mesmas foram eficientes no controle de patógenos avaliados no presente trabalho, bem como de diferentes patógenos em outros trabalhos (MOURA; ROMEIRO; NEVES, 1998; NAUE, 2009), e sendo a inespecificidade de controle um dos critérios para a ocorrência da indução de resistência (SCHONBECK; STEINER; KRASKA, 1993).

2.4 – Conclusões

A rizobactéria DFs1420 (*Bacillus* sp.) tem efeito antagônico contra *R. solanacearum* e reduz a intensidade da murcha bacteriana quando microbiolizada as sementes.

A microbiolização das sementes de tomate com as rizobactérias DFs1296, DFs1315 (*Streptomyces* sp.) e DFs1414 (*Bacillus* sp.) reduz a severidade da murcha de fusário, sendo o antagonismo pela produção de quitinases e compostos voláteis um dos possíveis mecanismos atuantes.

3 - CAPÍTULOS 2 Rizobactérias no controle de doenças foliares do tomate em condições de campo

3.1 - Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das plantas oleráceas mais cultivadas no Brasil. Seu fruto é muito apreciado para consumo “in natura” e utilizado para elaboração de produtos industrializados. A cultura do tomate é atacada por inúmeros fitopatógenos, sendo que mais de 200 já foram descritos. Dentre as doenças foliares, pinta preta (*Alternaria solani* Jones; Grout), requeima (*Phytophthora infestans* De Bary) e septoriose (*Septoria lycopersici* Speg.) podem inviabilizar o cultivo do tomate em determinadas condições (LOPES; ÁVILA, 2005). Isso tem levado ao uso intensivo de agrotóxicos na cultura, sendo prejudicial ao meio ambiente, além de aumentar os custos de produção.

Consideradas as implicações ecológicas e sanitárias decorrentes do uso contínuo e intensivo de agrotóxicos, a busca por alternativas de manejo de doenças são importantes. O uso de microrganismos benéficos, agentes de controle biológico, como alternativa para aumentar a produtividade de plantas e melhorar o seu estado fitossanitário, vem sendo objeto da pesquisa agrícola. Dentre estes microrganismos, as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) apresentam grande potencial (MAKSIMOV; ABIZGIL'DINA; PUSENKOVA, 2011).

Rizobactérias como agentes de biocontrole têm sido estudadas, as quais podem atuar por diferentes mecanismos, tais como antibiose, competição, parasitismo ou indução de resistência (RAMAMOORTHY et al., 2001; HAAS; DÉFAGO, 2005). A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou

abióticos (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). O uso de rizobactérias como indutores de resistência sistêmica (ISR) é uma ferramenta para controle doenças que tem recebido atenção de muitos pesquisadores (RAMAMOORTHY et al., 2001; KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004.)

Rizobactérias podem induzir resistência contra um amplo espectro de patógenos, incluindo bactérias, fungos, nematóides e vírus (SILVA et al., 2004a). Seu uso representa uma vantagem sobre métodos de controle biológicos clássicos e químicos, em que as plantas são tipicamente protegidas contra apenas alguns patógenos (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). De acordo com Ryals et al. (1996) uma vez que mecanismos naturais de resistência da planta são ativados, o aumento da capacidade defensiva é mantido por um determinado período contra um amplo espectro de patógenos.

A proteção com base apenas em agentes de controle biológico nem sempre é estável e raramente é tão eficaz quanto o tratamento químico. No entanto, medidas de manejo integrado de doenças, pode ser uma alternativa para diminuir o número de aplicações de agrotóxicos e aumentar a eficácia e estabilidade do controle (SILVA et al., 2004b). Atualmente, existe no mercado produtos que embora químicos, não possuem ação direta sobre o patógeno, como acibenzolar-S-metil (ASM). Este produto é um análogo funcional do ácido salicílico, o qual age como indutor abiótico de resistência em plantas. O ácido promove nas células vegetais estímulo à produção de proteínas específicas relacionadas com a patogênese capazes de degradar a parede celular de fungos e bactérias (VALLAD; GOODMAN, 2004).

Existem vários relatos sobre o uso de rizobactérias como agentes de controle biológico de doenças foliares na cultura do tomate, tais como *A. solani* (LATHA, et al., 2009), *P. infestans* (YAN et al., 2002; SILVA et al., 2004b; LOURENÇO JÚNIOR et al., 2006). Porém, existem poucos trabalhos com rizobactérias no controle de *S. lycopersici*, patógeno muito frequente na cultura do tomate, principalmente em períodos de temperaturas elevadas na região de Pelotas, RS. Além disso, grande parte destes trabalhos é realizada sob condições controladas e poucos trabalhos demonstram a eficácia destes agentes em condições de campo, principalmente para patógenos agressivos em culturas que demandam um grande número de aplicações de agrotóxicos, como no tomate.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de rizobactérias, selecionadas para controle de mancha bacteriana e de oídio (NAUE, 2009), na proteção de plantas de tomate contra doenças da parte aérea em condições de campo.

3.2 - Material e métodos

3.2.1 – Microrganismos utilizados

As rizobactérias utilizadas (Tabela 1) foram pré-selecionadas como antagonista contra *R. solanacearum* (MOURA; ROMEIRO; NEVES, 1998), *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic) Jones et. al. e oídio, *Oidium* sp. (NAUE, 2009) e como promotores de crescimento (DEUNER, 2004). Estes isolados fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas.

Tabela 7. Rizobactérias utilizadas como agentes de controle biológico

Isolados	Gêneros	Nicho de isolamento
DFs1296	<i>Streptomyces</i> (Waksman; Henrici)	Solo sob cultivo de gramíneas
DFs1315	<i>Streptomyces</i> (Waksman; Henrici)	Solo sob cultivo de citros
DFs1414	<i>Bacillus</i> (Cohn)	Solo de rizosfera de tomate
DFs1420	<i>Bacillus</i> (Cohn)	Solo de rizosfera de tomate
DFs1421	<i>Pseudomonas</i> (Migula)	Solo de rizosfera de tomate
DFs1423	<i>Bacillus</i> (Cohn)	Solo de rizosfera de tomate

3.2.2 - Microbiolização das sementes

Cada suspensão bacteriana foi preparada pela adição de um volume de solução salina (0,85% NaCl) suficiente para cobrir o crescimento de cada

rizobactéria com 24 h de incubação em meio 523 de Kado; Heskett (1970). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para $A_{540}=0,50$, correspondendo a aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias por mL ($ufc.mL^{-1}$).

Sementes de tomate c.v Super Marmande foram imersas durante 4 h sob agitação e temperatura de 4 °C, em suspensão de cada rizobactéria. A testemunha constituiu-se de sementes imersas em solução salina.

Cinco sementes de tomate microbiolizadas com cada rizobactéria foram semeadas em copos plásticos de 500 mL contendo substrato agrícola Carolina[®] não esterilizado. Após germinação foi realizado o desbaste, deixando uma planta por copo e mantido em casa de vegetação até o momento de transplante para campo.

3.2.3 – Ensaio em campo

O potencial de biocontrole das rizobactérias em condições de campo foi avaliado em três ensaios, localizados na estação experimental da Embrapa Clima Temperado, no município de Pelotas-RS. Os experimentos foram conduzidos sempre durante o verão nos anos agrícolas de 2008/2009 e 2010/2011. O primeiro e o terceiro ensaios foram conduzidos em solo sem adição de fertilizantes. Porém, devido aos sintomas de deficiência mineral exibido pelas plantas no primeiro ensaio, para o segundo ensaio, foram realizadas as correções de adubação e calagem do solo conforme as recomendações para cultura, e expectativa de rendimento de 60 toneladas por hectare (CQFS RS/SC, 2004).

As mudas obtidas em casa de vegetação, 30 dias após a semeadura foram transplantadas para o campo com espaçamento 1 m entre linhas e 0,60 m nas linhas. A irrigação foi feita por gotejamento a cada dois ou três dias, mantendo-se a umidade do solo próximo à capacidade de campo. Manteve-se a área livre de plantas daninhas através de capina manual.

O delineamento constituiu-se em blocos ao acaso, com quatro repetições e quatro plantas úteis por parcela. Para o primeiro e segundo ensaios, os tratamentos constituíram da microbiolização das sementes com as seis rizobactérias (Tabela 7), mais dois tratamentos com aplicação de fungicida e ativador de plantas, metiram + piraclostrobina (produto comercial Cabrio Top[®] 4 g.L⁻¹) e acibenzolar-S-metil (Bion 500 WG[®] 0,05 g.L⁻¹), respectivamente.

No terceiro ensaio foram avaliados os seguintes tratamentos: DFs1423, DFs1315, DFs1296 microbiolizadas às sementes, pulverização semanal de DFs1296 na parte aérea, fungicida metalaxil + mancozebe (Ridomil Gold MZ[®] 4 g.L⁻¹) alternando com tebuconazol (Folicur PM[®] 1 g.L⁻¹), e sementes imersas em solução salina.

Os tratamentos com pulverização foliar foram iniciados três semanas após o transplante das plantas para campo, com aplicações semanais, até próximo à colheita de frutos. Todos os tratamentos com pulverizações na parte aérea e a testemunha tiveram as plantas originadas de sementes imersas em solução salina apenas, sem microbiolização com rizobactérias.

3.2.4 - Avaliações

Os fitopatógenos avaliados ocorreram de forma natural sem inoculação prévia. No primeiro e segundo ensaios foi monitorada a ocorrência de septoriose e requeima. A avaliação da severidade de *Septoria lycopersici* foi iniciada aos 55 dias após o transplante e realizada a cada sete dias por quatro semanas, usando uma escala ordinal (0-5) de dano foliar adaptado de Satelis; Boiteux; Reis, 2010: onde, 0 = planta sem sintomas; 1 = lesões foliares limitadas à terceira parte basal das plantas, várias lesões em folhas inferiores, mas sem coalescência das lesões; 2 = secção superior das plantas livres de lesões foliares, muitas lesões presentes nas folhas basais, mas com coalescência raras; 3 = topo das plantas livre de lesões foliares, muitas lesões nas folhas basais das plantas, muitas vezes coalescentes; 4 = secção superior das plantas livres de lesões foliares, muitas lesões nas folhas localizadas na porção mediana das plantas com coalescência, mas raramente ocorrendo 50% da área foliar; 5 = topo da planta exibindo várias lesões foliares, muitas lesões sobre as folhas intermediárias e basais com coalescência, lesões que cobrem mais de 50% da área foliar, queda prematura das folhas.

O nível de severidade de *P. infestans* foi avaliado após 65 dias do transplante e repetido a cada três dias por duas semanas. A escala de notas utilizada (1-10) foi descrita por Cohen (1994), onde: 1= folhas sem sintomas; 2= pequenas lesões circulares de 1 a 2 mm; 3= até 5% de área foliar com lesões; 4= 5 a 10% de lesões; 5= 10 a 25%; 6= 25 a 50%; 7= 50 a 75%; 8= 75 a 85%; 9= 85 a 95%; e 10= 95 a 100% de área foliar com requeima.

No terceiro ensaio, as avaliações iniciaram 60 dias após transplante, a cada sete dias durante três semanas. A severidade foi avaliada pela quantificação da porcentagem de folhas com manchas foliares (ARAUJO; MENEZES, 2009), para as seguintes doenças: requeima, septoriose, pinta preta e oídio.

A colheita foi realizada de forma escalonada, iniciada aproximadamente 60 dias após transplante, em intervalos de sete dias. Inicialmente apenas frutos de tomate de coloração vermelha foram colhidos, posteriormente, ao término das avaliações para doenças, frutos verdes e vermelhos foram colhidos. O rendimento acumulado foi calculado como peso de frutos por parcela.

3.2.5 - Procedimento estatístico

No primeiro e segundo ensaios, com os dados de notas obtidos, foi calculado o índice de severidade de doença (ISD) para cada parcela (MCKINNEY, citado por SATELIS; BOITEUX; REIS, 2010), usando a seguinte fórmula: $ISD = [\sum (\text{nota de severidade} \times \text{número de plantas com cada nota}) / (\text{número total de plantas avaliadas} \times \text{maior nota da escala})] \times 100$. Os dados de foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ e utilizados para análise de variância e teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No terceiro ensaio, os dados de severidade foram utilizados para cálculo da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), utilizando programa desenvolvido por Maffia (1995). Os dados de AACPD e produção foram submetidos a análise de variância e teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

3.3 - Resultados e discussão

No primeiro ensaio, houve infecção natural apenas de *Septoria lycopersici* durante o período de avaliação. No segundo ensaio foi observada a ocorrência de *S. lycopersici* e de *P. infestans*.

Os tratamentos com as rizobactérias reduziram a severidade de *S. lycopersici*, tanto no primeiro, como no segundo ensaios. Dentre os tratamentos biológicos, as rizobactérias DFs1414 e DFs1421 foram as que apresentaram os menores valores de severidade para septoriose (Tabela 8). Para *P. infestans* os tratamentos com as rizobactérias DFs1420 e DFs1296 foram efetivos.

O tratamento com aplicação foliar do indutor químico acibenzolar-S-metil (ASM), assim como fungicida, promoveu redução significativa na severidade de *S. lycopersici* em ambos os ensaios e de *P. infestans* no segundo ensaio (Tabela 8). Pode-se observar que algumas rizobactérias e aplicação foliar de ASM para controle *S. lycopersici* e *P. infestans* foram colocados no mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott. Por outro lado, o tratamento com fungicida formou um grupo isolado (Tabela 8).

Com relação à produção de frutos pode-se observar a formação de dois grupos, sendo os tratamentos com as rizobactérias DFs1296, DFs1414 e DFs1423 os que apresentaram maior produção, agrupados juntamente com o tratamento com fungicida, enquanto as demais rizobactérias e ASM tiveram menor produção e foram agrupados com testemunha, tratada com solução salina.

Tabela 8. Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias e aplicação foliar de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a severidade de doença (ISD) da septoriose e requeima do tomate, em condições de campo. (Ensaio 1 e 2)

Tratamento	Ensaio 1		Ensaio 2	
	<i>S. lycopersici</i> ¹	<i>S. lycopersici</i>	<i>P. infestans</i>	Produção (kg/parcela)
Salina	9,51a ²	9,31a	9,38a	1,48b
DFs1296	7,8b	6,03c	8,0b	2,62a
DFs1315	7,63b	6,38c	9,28a	2,19b
DFs1414	5,6c	5,85c	8,93a	2,6a
DFs1420	8,97a	6,76c	7,65b	1,68b
DFs1421	7,1b	5,26c	9,0a	2,05b
DFs1423	7,64b	7,6b	9,14a	2,62a
ASM ³	6,9b	6,33c	8,05b	2,1b
Fungicida ⁴	3,54d	3,51d	5,72c	3,62a
CV (%)	11,11	12,56	44,66	29,95

¹ISD = $[\sum (\text{nota de severidade} \times \text{número de plantas com cada nota}) / (\text{número total de plantas avaliadas} \times \text{maior nota da escala})] \times 100$.

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p = 0,05$).

³Acibenzolar-S-metil, produto comercial Bion 500 WG[®] 0,05 g.L⁻¹

⁴Metiram + piraclostrobina, produto comercial Cabrio Top[®] 4 g.L⁻¹

No ensaio 3, infecções naturais de *A. solani*, *P. infestans*, *S. lycopersici* e *Oidium* sp. ocorreram durante o período de avaliação. Os tratamentos com rizobactérias foram variáveis quanto à capacidade de reduzir a severidade das doenças. Porém, a rizobactéria DFs1296, quando aplicado via pulverização foliar foi o único tratamento

efetivo em reduzir o progresso de todas as doenças avaliadas, com eficiência similar ao uso de fungicidas (Tabela 9). Por outro lado, somente a rizobactéria DFs1423 não controlou nenhuma das doenças avaliadas.

Todos os tratamentos com rizobactérias, exceto DFs1423, proporcionaram redução da severidade da requeima (*P. infestans*) e da pinta preta (*A. solani*). Para *S. lycopersici*, os tratamentos com a rizobactéria DFs1296 aplicada via microbiolização das sementes ou pulverização foliar foram os mais eficazes. Enquanto, para *Oidium* sp., apenas aplicação na parte aérea de DFs1296 resultou em menor valor AACPD (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito de rizobactérias sobre progresso de doenças foliares (AACPD) e produção de frutos do tomate em condições de campo. (Ensaio 3)

Tratamento	<i>P. infestans</i>	<i>A. solani</i>	<i>S. lycopersici</i>	<i>Oidium</i> sp.	Produção (kg/parcela)
Salina	162,9a ¹	210,9a	118,1a	223,6a	9,3a
DFs1296A ²	73,8b	119,5b	52,5b	20,6b	9,8a
DFs1315	93,2b	164,5b	106,8a	274,7a	8,9a
DFs1423	139a	304,5a	142,6a	231,9a	8,9a
DFs1296	76,6b	113,3b	77,9b	140,9a	9,1a
Fungicidas ³	45,6b	45,6b	13,2b	10,1b	11,1a
CV (%)	32,5	45,9	42,6	66,5	18,3

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott ($p = 0,05$).

²Rizobactéria DFs1296 aplicado via pulverização foliar.

³Metalaxil + mancozebe (Ridomil Gold Mz[®] 4 g.L⁻¹) alternando com tebuconazol (Folicur PM[®] 1 g.L⁻¹)
AACPD: área abaixo da curva do progresso da doença

Em relação à produção de frutos de tomate, foi observada a formação de um grupo apenas, não sendo detectada diferença no rendimento entre os tratamentos neste ensaio.

Algumas rizobactérias foram capazes de proteger as plantas contra mais de um patógeno, exceto DFs1414, DFs1421 e DFS1423, que foram efetivas somente para o controle da septoriose. As bactérias mostraram-se estáveis, mantendo-se efetivas em todos os ensaios em que foram avaliadas para o controle de *S. lycopersici* (exceto DFs1420) e DFs1296, para controle de *P. infestans*. Por outro lado, a pinta preta e o oídio foram doenças que ocorreram somente em um dos ensaios, impossibilitando a verificação da estabilidade do controle proporcionado por DFs1296 e DFs1315 em microbiolização das sementes para o controle da primeira e por pulverização foliar de DFs1296, para a segunda.

De modo geral, o isolado de *Streptomyces* DFs1296 foi efetivo nos três ensaios, para 3 das quatro doenças avaliadas, com acréscimo de produção em relação à testemunha não tratada e também ao tratamento com indutor de resistência ASM. Quando este foi aplicado em pulverização foliar, houve ampliação do espectro de ação, controlando as quatro doenças em questão, embora neste caso, não tenha aumento a produção. Espécies de *Streptomyces* têm sido relatadas como agentes de controle biológico eficaz contra diversos patógenos (HAMDALI et al., 2008; CARRER et al., 2009; LI et al., 2011). Varias espécies de *Streptomyces* têm sido utilizadas com sucesso em formulações para controle de doenças fúngicas em diversas culturas (SIVA; JAMES, 2002; MINUTO et al., 2006).

São poucos os trabalhos com uso de rizobactérias para controle da septoriose, porém, em se tratando de doenças foliares em geral, os dados apresentados confirmam resultados obtidos na literatura em que espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* foram capazes de controlar patógenos foliares, inclusive *S. lycopersici* (BLUM, 2000; SILVA et al., 2004b; ARAUJO; MENEZES, 2009).

Em trabalho anterior, realizado em casa de vegetação, as mesmas rizobactérias utilizadas neste estudo protegeram as plantas de tomate contra mancha bacteriana (*X. gardneri*) e ou oídio (*Oidium* sp.) (NAUE, 2009), embora tenham variado de intensidade e estabilidade em função do patógeno desafiador. Em conjunto com os dados obtidos no presente trabalho, estes resultados estão de acordo com os disponíveis na literatura, em que a proteção das plantas por rizobactérias pode ocorrer contra múltiplos patógenos (JETIYANON; KLOEPFER, 2002; SILVA et al., 2004a; JETIYANON, 2007), sugerindo assim, que a indução de resistência sistêmica (ISR) pode ser um dos mecanismos determinantes do controle.

Um dos critérios para que ocorra indução de resistência é a separação física entre o agente indutor e agente patogênico em estudo, fato ocorrido nos tratamentos com microbiolização das sementes. Adicionalmente a proteção ampla alcançada, tanto pela microbiolização de sementes quanto pela pulverização foliar com a rizobactéria DFs1296, sugere que esta possa agir por indução de resistência, uma vez que a inespecificidade de controle é outro critério relacionado à ocorrência da indução de resistência (SCHONBECK; STEINER; KRASKA, 1993).

Por outro lado não se descarta a possibilidade da ocorrência de mecanismos de antagonismo direto, pois segundo Yan et al. (2002), apesar da aplicação das rizobactérias através das sementes, estas podem atingir a parte aérea e induzir diversas interações na superfície foliar. Esta possibilidade ganha peso quando se sabe que dentre as rizobactérias utilizadas no presente trabalho, todas apresentaram atividade antifúngica, mediada por compostos voláteis ou não (DEUNER, 2004; NAUE, 2009) e antibacteriana por compostos não voláteis, exceto DFs1296 e DFS1421 (DEUNER, 2004)

Entretanto, Van Loon; Bakker; Pieterse (1998) advertem que a proteção de plantas contra patógenos apenas com base em agentes de biocontrole ainda não é viável e que agentes de biocontrole raramente apresentam a mesma eficácia de produtos químicos, principalmente contra patógenos agressivos como *P. infestans*, sendo que o uso combinado de controle biológico e produtos químicos pode ser uma medida de controle que traz equilíbrio e eficiência. Este fato foi observado em trabalho em que o uso de uma rizobactéria, isolado 'UFV-101' de *Bacillus cereus* Frankland; Frankland promoveu o controle de doenças de tomateiro em condições de campo e o seu uso em conjunto com clorotalonil permitiu reduzir o número de aplicações do fungicida pela metade, ao longo de 90 dias (SILVA et al., 2004b).

A diferença observada dos tratamentos com rizobactérias em relação aos fungicidas pode estar relacionada a alguns fatores como a ausência de uma formulação que proteja o antagonista quando dispensado via semente. Após a semeadura, o microrganismo necessita estabelecer-se e competir com outros organismos existentes no solo, além de ter que se adaptar a uma nova condição ambiental (LUCY; REED; GLICK, 2004). Também não se conhece exatamente quais os mecanismos de controle que estão envolvidos, não sendo possível potencializá-los.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que estas rizobactérias são promissores agentes de biocontrole de doenças foliares do tomateiro, tendo a mesma eficácia do indutor químico ASM, com vantagem adicional de poder incrementar a produção. No entanto, para que futuramente se tenha a possibilidade de desenvolver produtos a partir destas rizobactérias, estudos devem ser realizados tais como formulações, doses e concentração adequada de cada rizobactéria, intervalos de aplicações, sobrevivência destas rizobactérias no solo e no filoplano.

3.4 – Conclusões

A microbiolização de sementes com as rizobactérias DFs1414 (*Bacillus* sp.), DFs1421 (*Pseudomonas* sp.) e DFs1296 (*Streptomyces* sp.) proporcionam proteção estável e efetiva de plantas de tomate em campo contra *Septoria lycopersici*.

DFs1296 (*Streptomyces* sp.) microbiolizada às sementes ou via pulverização foliar resulta em controle eficiente e estável da requeima em condições de campo.

DFs1296 (*Streptomyces* sp.) microbiolizada às sementes ou via pulverização foliar resulta em amplo espectro de controle de doenças foliares em condições de campo.

A utilização de rizobactérias para o controle de doenças foliares do tomate pode alcançar efeito semelhante à aplicação de produtos químicos registrados para o controle destas.

4 – Conclusão

Rizobactérias previamente selecionadas, para controle da mancha bacteriana e oídio, possuem ação contra um amplo espectro de patógenos, conferindo proteção contra *R. solanacearum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em casa de vegetação e contra *S. lycopersici* e *P. infestans* em condições de campo. O antagonismo pela produção de enzimas quitinases e compostos voláteis parece ser um mecanismo importante neste controle, porém é possível que estas rizobactérias possam atuar por outros mecanismos como indução de resistência sistêmica.

5 - Referências

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635p.

AJIT, N.S.; VERMA, R.; SHANMUGAM, V. Extracellular chitinase of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. **Current Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 310-316, 2006.

ALVARENGA, M.A.R. Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M.A.R. (Ed.) **Tomate**: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: Editora UFLA, 2004. p. 15-18.

ANITH, K. N. MOMOL, M.T. Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl, and soil amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. **Plant Disease**, v. 88, n. 6, p. 669-673, 2004.

ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (acibenzolar-S-metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BLUM, L.E.B. Reduction of incidence and severity of *Septoria lycopersici* leaf spot of tomato with bacteria and yeasts. **Ciência Rural**, v.30, n. 5, p.761-765, 2000.

BLUME, E.; JARA, A.S.A. Moléstias em tomateiro cultivado em estufas plásticas em quatro municípios da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n. 3, p. 661-666, 2004.

BOUKAEW, S.; CHUENCHIT, S.; PETCHARAT, V. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. **Biocontrol**, v. 56, n. 3, p. 365-374, 2011.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CARRER, F.R.; ROMEIRO, R.S.; AMARAL, L.S.; GARCIA, F.A.O. Potenciality of an actinomycete from tomato rhizosphere as a biocontrol agent for tomato diseases. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 340-344, 2009.

CHANDEL, S.; EUNICE J.; ALLAN, E.J.; WOODWARD, S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, n. 7, p. 470-478, 2010.

COHEN, Y. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. **Phytopathology**, v. 84, n. 1, p. 55-59, 1994.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.

DEUNER, C.C. **Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. 2004, 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: ALLEN, C., PRIOR, P.; HAYWARD, A.C. (Eds.) **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. p. 449-461. St. Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. p. 193-214.

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

GURGEL, L.M.S.; OLIVEIRA, S.M.A.; COÊLHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. Proteção à murcha de fusário do tomateiro com acibenzolar-S-metil e ácido â-aminobutírico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 655-657, 2005.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 307-319, 2005.

HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 3, p. 510-517, 2008.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1855-1869, 1996.

HARIPRASAD, P.; DIVAKARA, S.T.; NIRANJANA, S.R. Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of *Fusarium* wilt in tomato. **Crop Protection**, v. 30, n. 12, p. 1606-1612, 2011.

HAYWARD, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (eds.) **Bacterial wilt, the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 123-136.

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

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

HE, L.Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**, v. 67, p. 1357-1361, 1983.

IBGE, Produção Agrícola Municipal 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat>>. Acessado em: 2 outubro. 2011.

JETIYANON, K. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. **Biological Control**, v. 42, n. 2, p.178-185, 2007.

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

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

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v. 44, n. 12, p. 693-695, 1954.

KISHORE, G.K.; PANDE, S. Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of *Botrytis* gray mold disease in chickpea under controlled conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 98-105, 2007.

KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 1219-1232, 1992.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant-growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, n. 5777, p. 885-886, 1980.

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

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE,

J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, 3.ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 607-626.

LATHA, P.; ANAND T.; RAGUPATHI N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 85-93, 2009.

LEMESSA, F.; ZELLER, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. **Biological Control**, v. 42, n. 3, p. 336-344, 2007.

LI, Q; NING, P; ZHENG, L; HUANG, J; GUOQING, L; HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control**, v. 61, p. 113-120, 2012.

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

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005. 152 p.

LOURENÇO JÚNIOR, V.; MAYA, L.A.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. **Biological Control**, v. 38, n. 3, p. 331-340, 2006.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 1-25, 2004.

MAFFIA, A. L. **Programa para cálculo de área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) Gw-basic 3.20**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa- Departamento de Fitopatologia, 1995.

MAKSIMOV, I.V.; ABIZGIL'DINA, R.R.; PUSENKOVA, L.I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 333-345, 2011.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: UFRPE, 2005. 184p.

MESSIHA, N.; VAN DIEPENINGEN, A.; FARAG, N.; ABDALLAH, S.; JANSE, J.; VAN BRUGGEN, A. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 118, n. 3, p. 211-225, 2007.

MINUTO, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, v. 25, n. 5, p. 468-475, 2006.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S.; NEVES, M.C.P. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 2065-2072, 1998.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Avaliação “in vitro” de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 2, p. 281-288, 1999.

NAUE, C.R. **Rizobactérias promotoras de crescimento: controle de patógenos, promoção de crescimento e reflexos na qualidade do fruto do tomateiro**. 2009, 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

NGUYEN, M.T.; RANAMUKHAARACHCHI, S.L. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 395-405, 2010.

PALOZZA, P.; PARRONE, N.; SIMONE, R.; CATALANO, A. Role of lycopene in the control of ROS-mediated cell growth: implications in cancer prevention. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1846-1860, 2011.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant and Soil**, v. 239, n. 1, p. 55-68, 2002.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

REIS, A.; BOITEUX, L.S. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 451-454, 2007.

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; LOPES, C.A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of "in vitro" screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 524-532, 1991.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SATELIS, J.F.; BOITEUX, L.S.; REIS, A. Resistance to *Septoria lycopersici* in *Solanum* (section *Lycopersicon*) species and in progenies of *S. lycopersicum* × *S. peruvianum*. **Scientia Agricola**, v.67, n. 3, p.334-341, 2010.

SCHONBECK, F.; STEINER, U.; KRASKA, T. Induced resistance - criteria, mechanisms, practical application and estimation. **Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz - Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 100, n. 5, p. 541-557, 1993.

SHANMUGAM, V.; KANOUIA, N. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. **Biological Control**, v. 57, n. 2, p. 85-93, 2011.

SIDDIQUI, I. A.; QURESHI, S.A.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFFAR, A. Biological control of root rot-root knot disease complex of tomato. **Plant and Soil**, v. 227, n. 1-2, p. 163-169, 2000.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.D.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, n. 2, p. 288-295, 2004a.

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

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SILVEIRA, N.S.S.D.; MARIANO, R.D.L.R.; MICHEREFF, S.J. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 22, n. 2, p. 97-111. 1996.

SIVA, S.; JAMES, A.T. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of rhizoctonia damping-off in tomato transplant. **Biological Control** v. 23, n. 3, p. 245-253, 2002.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.S.; GARRIDO, M.S. *Streptomyces* antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*. **Ciência Rural**, v.39, n. 6, p. 1897-1900, 2009.

SON, S.H.; KHAN, Z.; KIM, S.G.; KIM Y.H. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, v. 524-532, 2009.

ST CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 247-268, 2010.

THANH, D.T.; TARN, L.T.T.; HANH, N.T.; TUYEN, N.H.; BHARATHKUMAR, SRINIVASAN; LEE, SANG VEOB; PARK, KYUNG-SEOK. Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in vietnam. **Plant Pathology Journal**, v. 25, n. 3, p. 263-269, 2009.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 281-284, 2001.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, v. 44, n. 6, p. 1920-1934, 2004.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998.

VANITHA, S.C.; NIRANJANA, S.R.; MORTENSEN, C.N.; UMESHA, S. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. **Biocontrol**, v. 54, n. 5, p. 685-695, 2009.

WEI, Z.; YANG, X.; YIN, S.; SHEN, Q.; RAN, W.; XU, Y. Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. **Applied Soil Ecology**, v. 48, n. 2, p. 152-159, 2011.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WRIGHT, D.J.; PERRY, R.N. Reproduction, physiology and biochemistry. In: PERRY, R.N.; MOENS, M. (eds). **Plant Nematology**. Wallingford: CABI, 2006. p. 185-202.

XUE, Q.Y.; CHEN, Y.; LI, S.M.; CHEN, L.F.; DING, G.C.; GUO, D.W.; GUO, J.H. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. **Biological Control**, v. 48, n. 3, p. 252-258, 2009.

YAN, Z.N.; REDDY, M.S.; RYU, C.M.; MCINROY, J.A.; WILSON, M.; KLOEPPER, J.W. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 92, n. 12, p. 1329-1333, 2002.