



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA

SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS VISANDO O CONTROLE  
BIOLÓGICO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum* L.)

BOA VISTA  
RORAIMA - BRASIL  
2009

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA

**SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS VISANDO O CONTROLE  
BIOLÓGICO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum* L.)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Orientador (a): Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Boa Vista  
Roraima - Brasil  
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

B238s Barbosa, Rosianne Nara Thomé.  
Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Rosianne Nara Thomé Barbosa – Boa Vista, 2009.  
44 f. : il

Orientador: Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira.  
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia - POSAGRO, Universidade Federal de Roraima.

1 – Agronomia. 2 – *Sclerotium rolfsii*. 3 – Produção de inóculo. 4 – Métodos de inoculação. 5 – Fungo de solo. 6 – Antibiose. 7 - Ácido oxálico. I – Título. II – Vieira, Bernardo de Almeida Halfeld.

CDU – 635.64

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA

**SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS VISANDO O CONTROLE  
BIOLÓGICO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO EM TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Aprovada: 18 de março de 2009

---

Pesquisador Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira  
Orientador - Embrapa Roraima

---

Pesquisadora Dra. Kátia de Lima Nechet  
Coorientadora - Embrapa Roraima

---

Profa. Dra. Gisele Barata da Silva  
UFRA

---

Prof. Dr. Jefferson Fernandes do Nascimento  
UFRR

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais, Lázaro e Ivilete.

Ao meu esposo, Antônio Maurício.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Federal de Roraima e Embrapa Roraima, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, por aprovar o Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Ao Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira e a Dra. Kátia de Lima Nechet, pela excelente orientação, paciência, dedicação e amizade.

Aos membros da banca Profa. Dra. Gisele Barata da Silva e Prof. Dr. Jefferson Fernandes do Nascimento pelas excelentes sugestões para a conclusão deste trabalho.

Aos demais professores do curso pelo empenho, dedicação, paciência e compreensão.

Ao Ex-Secretário Adjunto de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Wellington Costa Rodrigues do Ó, pela amizade e pelo consentimento para cursar o Mestrado em Agronomia.

Ao Técnico em laboratório Giovanni Ribeiro de Souza, às estagiárias Dayane Rodrigues Youssef e Larisse Carneiro Amorim, à mestranda Gabriela Queiroz Pelzer e ao estagiário Wellington Robson Soares Cizino de Paiva, pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

Aos produtores rurais, Luís O. S. Mendes, Edijar Diniz da Silva, Dionísio Pereira Carlos, Evangelista Isidoro Ângelo, Gilmar Araújo, Antônio dos Santos Lima, José Ferino da Rocha e Jainy Rouse Magalhães Gomes pelo fornecimento das plantas de tomateiro utilizadas neste trabalho.

Aos Engenheiros Agrônomos, Erwin João de Morais Lima, Diego da Silva Barberena, Emerson Guedes dos Santos e Emerson Ricardo Vieira dos Santos e aos Técnicos em Agropecuária, Antônio Alves de Oliveira e Vilson Silva Chaves, pelo auxílio nas coletas.

Aos meus pais, Lázaro Barbosa e Ivilete Thomé Barbosa e ao meu esposo, Antônio Maurício da Silva Peixoto, por sempre acreditarem mim e pelo constante apoio para esta conquista.

Aos amigos Samuel Carlos de Santana, Marta Cecília Mota de Macêdo Hengen e Roberto Carlos da Silva pela compreensão e constante apoio para a conclusão deste trabalho.

Às amigas Cylles Zara dos Reis Barbosa, Lionésia da Silva Esbell e Shirlany Ribeiro de Melo, pelo companheirismo, carinho e incentivo em todos os momentos do curso.

À todos meu muito obrigada.

## BIOGRAFIA

ROSIANNE NARA THOMÉ BARBOSA, filha de Lázaro Barbosa e Ivilete Thomé Barbosa, nasceu em 16 de fevereiro de 1979, em Boa Vista-RR.

Em outubro de 2002, concluiu o curso de graduação em Bacharel em Agronomia, pela Universidade Federal de Roraima.

Em janeiro de 2003, foi admitida no curso de Pós-Graduação “lato sensu” em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, submetendo-se à defesa de monografia em 03 de junho de 2004.

Em maio de 2005, foi admitida no curso de Pós-Graduação “lato sensu” em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Roraima, submetendo-se à defesa de monografia em 18 de agosto de 2006.

Em abril de 2006, prestou concurso público no Governo do Estado de Roraima, sendo empossada no cargo de Engenheiro Agrônomo em 06 dezembro 2006.

Em março de 2007, foi admitida no curso de Mestrado em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, submetendo-se à defesa de dissertação em 18 de março de 2009.

BARBOSA, Rosianne Nara Thomé. **Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2009. 44 p., Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

## RESUMO

A murcha-de-esclerócio causada por *Sclerotium rolfsii* é uma das mais importantes doenças do tomateiro em regiões tropicais. Seu controle é difícil, havendo perspectivas do uso de microrganismos antagonistas, já que medidas convencionais não apresentam eficiência satisfatória. O uso de rizobactérias é uma das alternativas viáveis no controle de doenças e na redução ou substituição do uso de defensivos químicos no controle de doenças de plantas, principalmente causadas por patógenos de solo. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar rizobactérias que promovam o controle da murcha-de-esclerócio sem afetar o crescimento das plantas de tomateiro e verificar se o mecanismo de antibiose e a inibição da difusão do ácido oxálico têm relação com a capacidade de controle. Ajustes metodológicos para indução da murcha-de-esclerócio, sem a incitação de ferimentos em plantas de tomateiro, foram realizados previamente utilizando-se 2, 4, 8 e 16 g de arroz colonizado.L<sup>-1</sup> incorporados ao solo e 2, 4, 6 e 8 escleródios ou discos de micélio, depositados na superfície do solo. A seleção de rizobactérias foi realizada em casa de vegetação através de seis ciclos de seleção massal, e os melhores isolados foram reavaliados em três experimentos, utilizando-se como variáveis a severidade da doença, altura e matéria seca das plantas. Todos os isolados também foram avaliados por testes de antibiose e inibição da difusão do ácido oxálico *in vitro*. Os resultados obtidos demonstram que: a incorporação de 8 g de arroz colonizado.L<sup>-1</sup> de solo é a concentração e o tipo de inóculo ideal para a inoculação do patógeno, sem incitação de ferimentos; o isolado 38291 foi o único a restringir o desenvolvimento do patógeno *in vitro* por meio de antibiose e de controlar a murcha-de-esclerócio *in vivo*. Os isolados 31233, 32238, 33282 e 41296 promoveram controle da murcha-de-esclerócio em casa de vegetação, sem atividade detectável *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Sclerotium rolfsii*, produção de inóculo, métodos de inoculação, fungo de solo, antibiose, ácido oxálico.



BARBOSA, Rosianne Nara Thomé. **Selection of rhizobacteria to the biological control of southern blight in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2009. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

### ABSTRACT

The southern blight caused by *Sclerotium rolfsii* is one of the most important diseases of tomato in tropical countries. The control is difficult and it is possible to use antagonist microorganisms, once conventional controls are not efficient. The use of rhizobacteria is one of viable disease control and on reduction or replace for the chemical products on plant disease control, meanly that caused by soil pathogen. The aim of this work was select rhizobacteria capable to control the southern blight with no effect on tomato growth and investigate the correlation of antibiosis mechanism and inhibition of oxalic acid diffusion with the control of disease. Methodological adjustments for induction of southern blight with no plant wounds were preview performed using 2, 4, 8 e 16 g of colonized rice.L<sup>-1</sup> mixed on soil and 2, 4, 6 e 8 sclerotia or micelial discs deposited on soil surface. The selection of rhizobacteria was performed on greenhouse through six cycles of massal selection and the best isolates were reevaluated in three experiments using the disease severity and plant growth as variables. All the isolates were evaluated for antibiosis tests and inhibition of oxalic acid diffusion *in vitro*. The results demonstrated that the mixed of 8 g of colonized rice.L<sup>-1</sup> on the soil is the best concentration and inoculum source for the pathogen inoculation with no wounds; the 38291 isolate was the only to restrict the pathogen development *in vitro* through antibiosis and to control the southern blight *in vivo*. The 31233, 32238, 33282 e 41296 isolates promoted control of southern blight on greenhouse conditions with no activity detected in *in vitro* assays.

**Keywords:** *Sclerotium rolfsii*, inoculum production, inoculation methods, soil inhabiting fungi, antibiosis, oxalic acid.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 O TOMATEIRO .....	3
2.2 <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. ....	4
2.3 MURCHA-DE-ESCLERÓCIO .....	6
2.4 RIZOBACTÉRIAS .....	7
2.4.1 Mecanismos de antagonismo das rizobactérias .....	8
2.4.1.1 Antibiose.....	8
2.4.1.2 Competição .....	9
2.4.1.3 Indução de resistência sistêmica.....	10
<b>3 ARTIGO A: MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE <i>Sclerotium rolfsii</i> EM TOMATEIRO</b> .....	<b>12</b>
3.1 RESUMO.....	12
3.2 ABSTRACT .....	12
3.3 INTRODUÇÃO .....	13
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.6 CONCLUSÕES .....	19
<b>4 ARTIGO B: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO (<i>Sclerotium rolfsii</i>) EM TOMATEIRO</b> .....	<b>20</b>
4.1 RESUMO.....	20
4.2 ABSTRACT .....	20
4.3 INTRODUÇÃO .....	21
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.4.1 Coletas de plantas de tomateiro .....	23
4.4.2 Isolamento das rizobactérias .....	23
4.4.3 Testes de antibiose e supressão da difusão do ácido oxálico .....	24
4.4.4 Seleção massal .....	24
4.4.5 Confirmação da efetividade das rizobactérias selecionadas .....	25
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.6 CONCLUSÕES .....	35
<b>5 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.5.1	Comparação das dissimilaridades estatísticas das retas realizada por teste t para os valores de intercepto e do coeficiente angular da reta.....	17
Tabela 4.5.1	Valores médios da severidade inicial da doença, severidade final e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) em plantas de tomateiro colonizadas por diferentes isolados de rizobactérias.....	30
Tabela 4.5.2	Valores médios da Altura, da Matéria Seca Total (M. S. Total), Matéria Seca da Raiz (M. S. Raiz) e Matéria Seca da Parte Área (M. S. Parte Aérea) de plantas de tomateiro inoculadas com diferentes isolados de rizobactérias.....	33

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 3.5.1.	Incidência da murcha-de-esclerócio em função da concentração de grãos de arroz colonizados.....	16
Figura 4.5.1.	Redução do crescimento micelial de <i>S. rolfsii</i> por rizobactérias.....	27
Figura 4.5.2.	Supressão da difusão do ácido oxálico por rizobactérias.....	27

## 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas (CARVALHO et al., 2002) e consumidas no mundo, sendo, portanto considerada uma cultura de grande importância econômica (FERNANDES et al., 2007).

No Brasil, essa cultura foi introduzida no final do século XIX por imigrantes europeus (ALVARENGA, 2004) e se tornou uma das atividades mais importantes na economia brasileira, tanto pelo seu valor econômico quanto por gerar inúmeros empregos (CARVALHO et al., 2003).

Em 2007, o Brasil se destacou como nono produtor mundial de tomate, com uma produção em torno de 3,3 milhões de toneladas, em aproximadamente 57 mil hectares (FAO, 2007). Os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais são os maiores produtores de tomate no país, respondendo juntos por 57,89% da produção nacional. Os demais estados brasileiros são responsáveis pelos 42,10% restantes da produção. Na região Norte, Roraima se destacou como o terceiro maior produtor de tomate, com produção estimada de 5.268 toneladas (IBGE, 2007).

Por ser uma das culturas mais cultivadas no Brasil, e, portanto estar distribuída em quase todos os Estados, a mesma está sujeita ao ataque de uma grande diversidade de patógenos, sendo os fungos os maiores responsáveis pelas doenças que ocorrem no tomateiro (LOPES e SANTOS, 1994). Dentre as doenças fúngicas, a murcha-de-esclerócio, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc. é uma das mais importantes em regiões tropicais, uma vez que provoca perdas na produção, em consequência da redução do estande durante o ciclo da cultura (CHAVES e COSTA, 1999).

A murcha-de-esclerócio é uma doença extremamente difícil de ser controlada (SERRA e SILVA, 2005), em função da ampla gama de hospedeiros, do crescimento prolífico do fungo e da produção de estruturas de resistência, denominadas escleródios (CARDOSO, 1990). Em função disso, medidas de controle como rotação de cultura, aração profunda, adubação com fertilizantes amoniacais, aplicação de calcário, e, em alguns casos, aplicação de fungicidas ao solo promovem apenas o controle parcial da doença. Algumas medidas de controle têm sido implementadas, como a solarização do solo e o uso de espécies de microrganismos antagonistas (AGRIOS, 2005).

Dentre os microrganismos antagônicos, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são atualmente os mais estudados e com potencial para serem utilizados na agricultura (ZAGO et al., 2000). Esses antagonistas são bactérias de solo que colonizam raízes e promovem o aumento no crescimento dessas plantas. Além disso, as rizobactérias se utilizam de diversos mecanismos específicos para promover a supressão de patógenos. Dentre esses, se inclui a antibiose, competição por substrato, parasitismo e indução de resistência sistêmica do hospedeiro (KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

Assim, diante da importância que a murcha-de-esclerócio representa para a cultura do tomateiro no Brasil, e de não haver implementado o uso prático, referente ao controle biológico, através de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, torna-se relevante conhecer o efeito destas bactérias sobre essa doença. Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar rizobactérias que promovam o controle da murcha-de-esclerócio, sem restringir o crescimento das plantas de tomateiro, investigando se a supressão da difusão de ácido oxálico e o mecanismo de antibiose estão relacionados com a capacidade de controle. Além de determinar tipo e concentração de inóculo mais adequados para induzir a murcha-de-esclerócio, sem provocar ferimentos em plantas de tomateiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O TOMATEIRO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma solanácea originária da América do Sul, de uma região compreendida entre o Equador e o Norte do Chile, sendo encontrado na forma silvestre ou cultivado, desde o nível do mar até 2.000 m de altitude (GOMES, 2005).

Os primeiros a domesticá-lo e cultivá-lo foram os povos das antigas civilizações mexicanas (KRONKA, 2004). Em 1544, o tomateiro foi introduzido na Europa, sendo mais tarde, disseminado da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio. Recentemente, distribuiu-se o tomate silvestre para outras partes da América do Sul e do México (NAIKA et al., 2006).

Atualmente, é uma das hortaliças mais cultivadas (CARVALHO et al., 2002) e consumidas no mundo, sendo considerada uma cultura de grande importância econômica (FERNANDES et al., 2007). Os frutos são consumidos tanto *in natura* quanto na forma industrializada, devido a fatores, como por exemplo, a versatilidade de uso, ao valor nutricional, a menor perecibilidade quando comparado a outras hortaliças e a possibilidade de processamento industrial (KRONKA, 2004).

No Brasil, foi introduzido no final do século XIX por imigrantes europeus (ALVARENGA, 2004) e a cultura se tornou uma das mais importantes na economia brasileira, tanto pelo seu valor econômico quanto por gerar inúmeros empregos (CARVALHO et al., 2003).

Em 2007, o Brasil destacou-se como nono produtor mundial de tomate, com uma produção em torno de 3,3 milhões de toneladas, em aproximadamente 57 mil hectares (FAO, 2007). Os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais são os maiores produtores de tomate no país, respondendo juntos por 57,89% da produção nacional. Os demais estados brasileiros são responsáveis pelos 42,10% restantes da produção (IBGE, 2007).

Nos últimos anos, Roraima apresentou um aumento da área cultivada

e da produção de tomate, o que permitiu ao Estado reduzir a dependência do produto proveniente do mercado externo (HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Atualmente, o Estado conta com produção estimada de 5.268 toneladas, obtidas de uma área plantada de 449 hectares, destacando-se, no ano de 2007, como o terceiro maior produtor de tomate da região Norte (IBGE, 2007). Contudo, até recentemente, a demanda local por essa hortaliça não era atendida devido à baixa produtividade do Estado em relação à média nacional, ocasionado pelo baixo nível tecnológico na condução da cultura. Conseqüentemente, o mercado local era suprido com importações de outros centros produtores, o que elevava demasiadamente os preços para o consumidor. Mesmo com o alto preço no mercado local, o cultivo do tomate em Roraima enfrenta entraves devido às exigências da cultura. Frequentemente, as causas de queda de safra são ataques de pragas e doenças, tratos culturais, adubação inadequada e uso de variedades não adaptadas à região (LUZ et al., 2002).

Segundo Halfeld-Vieira et al. (2006) dentre as doenças da cultura diagnosticadas no Estado, a murcha-de-esclerócio (*S. rolfsii*), ocorre amplamente em Roraima e tem sido frequentemente observada, causando danos principalmente em cultivos de tomateiro e pimentão.

## **2.2 *Sclerotium rolfsii* Sacc.**

*Sclerotium rolfsii* Sacc. é um fungo polífago (CHAVES e COSTA, 1999), habitante de solo, que exerce parasitismo do tipo necrotrófico. Neste tipo de parasitismo, o patógeno mata o tecido da planta antes da penetração e causa grandes danos ao hospedeiro (LUTRELL, 1974).

O fungo predomina em regiões de clima tropical e subtropical do mundo, onde as condições de temperaturas e umidades do ar elevadas favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência do patógeno (MARTINS, 2003).

Este patógeno produz um abundante e espesso micélio branco, frequentemente estéril, capaz apenas de formar uma estrutura de resistência denominada escleródio (AGRIOS, 2005). Os escleródios são formados por uma



massa compactada e melanizada de micélio (BLUM et al., 2002), que internamente é rico em glicogênio, lipídeos e trealose (DEACON, 1997). São estruturas esféricas com diâmetro de aproximadamente 2 mm, que inicialmente se apresentam brancas e posteriormente tornam-se marrons (INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, s.d). Através dos escleródios, o patógeno sobrevive no solo e em plantas doentes por longos períodos sob condições adversas, pois possui a capacidade de resistir à degradação química e biológica (ABO ELLIL, 1999).

A faixa de temperatura ideal para o seu crescimento vegetativo e formação de escleródios varia entre 27 e 30 °C, mas pode se desenvolver em uma faixa de temperatura que varia de 8 a 40 °C (PUNJA, 1985). Temperaturas abaixo de 0 °C e acima de 50 °C por longos períodos promovem a degradação dos escleródios (ADANDONON, 2004).

O fungo se desenvolve em diferentes tipos de solos e variações de pH, sendo que a umidade do solo entre 25 e 35% (CORTEZI et al., 2005) e pH em torno de 5,6 (CHAVES e COSTA, 1999) são condições ideais para seu desenvolvimento. Entretanto, solos com pH em torno de 7 promovem a inibição da germinação dos escleródios (PUNJA, 1985).

*S. rolfsii* tem como gama de hospedeiros cerca de 500 espécies de plantas cultivadas no mundo (ALMEIDA et al., 2001), sendo a grande maioria espécies dicotiledôneas (ADANDONON, 2004). Dentre estes hospedeiros, estão incluídos milho, feijão, batata doce, tomate, melancia, banana, beterraba, repolho, cenoura, café, algodão, alho, alface, manga e abacaxi (FERREIRA e BOLEY, 1992).

A ampla gama de hospedeiros do fungo se deve, principalmente, ao seu rápido crescimento, à produção de ácido oxálico e de enzimas degradadoras de parede celular (ALMEIDA et al., 2001). O ácido oxálico produzido durante o processo de parasitismo se combina com o cálcio, presente no tecido da planta afetada, e propicia a ação de enzimas pectolíticas. Estas enzimas são as responsáveis pela degradação dos tecidos (DEACON, 1997).

### 2.3 MURCHA-DE-ESCLERÓCIO

Uma vez estabelecido na planta *S. rolfsii* é responsável pela ocorrência de uma importante doença: a murcha-de-esclerócio. Essa doença ocasiona sérias perdas de produção nas plantas infectadas, provocadas pela redução do estande durante o ciclo da cultura (CHAVES e COSTA, 1999; EMBRAPA RONDÔNIA, 2005).

A murcha-de-esclerócio surge geralmente em pequenas reboleiras ou em plantas isoladas (LOPES e ÁVILA, 2005) e ocorre tanto em mudas como em plantas adultas. Em geral, as mudas são mais suscetíveis e morrem logo após a infecção (FERREIRA e BOLEY, 1992).

Os primeiros sintomas surgem no colo da planta, através de lesões marrons e aquosas. Com o desenvolvimento da doença, essas lesões avançam, produzem escurecimento e podridão do caule, causando a destruição do córtex e da raiz principal. Conseqüentemente, ocorre o amarelecimento das folhas inferiores e posteriormente das folhas superiores. Com o progresso da doença, ocorre o estrangulamento do colo das plantas afetadas (BLUM et al., 2003), onde pode ser observado um micélio cotonoso branco com ou sem escleródios (LOPES e ÁVILA, 2005). Esse estrangulamento ocasiona murcha e seca na parte aérea, queda de folhas e conseqüentemente a morte da planta (BLUM et al., 2003). Do mesmo modo, a doença também ocorre em frutos que entram em contanto com solo contaminado, os quais se desintegram em uma podridão mole (LOPES e SANTOS, 1994).

A disseminação da doença no campo ocorre por meio do solo, ferramentas e mudas contaminadas, água, vento e, em alguns casos, possivelmente por sementes (FERREIRA e BOLEY, 1992).

A murcha-de-esclerócio é uma doença extremamente difícil de ser controlada (SERRA e SILVA, 2005), em função da ampla gama de hospedeiros, do crescimento prolífico do fungo e da produção de estruturas de resistência, denominadas escleródios (CARDOSO, 1990). Em função disso, medidas de controle como rotação de cultura, aração profunda, adubação com fertilizantes amoniacais, aplicação de calcário, e, em alguns casos, aplicação

de fungicidas como PCNB ao solo promovem apenas o controle parcial da doença. A redução na severidade da doença, em baixos níveis, tem sido obtida pela solarização do solo e pelo uso de espécies de microrganismos antagonistas. Os últimos são utilizados para o tratamento de sementes ou órgãos propagativos cultivados em campos infestados pela doença. Entretanto, tais medidas ainda estão em fase experimental (AGRIOS, 2005).

Segundo Zago et al. (2000) atualmente as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são os microrganismos antagônicos mais estudados e com potencial para serem utilizados na agricultura.

## 2.4 RIZOBACTÉRIAS

As pesquisas com rizobactérias não simbióticas foram iniciadas com o objetivo de aumentar o crescimento e o rendimento das plantas. Essas investigações começaram em 1885 na Rússia e na Ucrânia, usando-se *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies do gênero *Bacillus*. Contudo, somente após os trabalhos de Kloepper e Schroth, em 1978, com batata e rabanete, em que os autores comprovaram a capacidade das rizobactérias em promover o crescimento e a bioproteção de plantas, é que foi estabelecido o conceito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (LUZ, 1996).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são bactérias de solo que colonizam raízes de plantas, promovendo o aumento no seu crescimento, e que utilizam de diversos mecanismos específicos para promover a supressão de patógenos (KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

As principais rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são as *Pseudomonas* spp. Migula 1894, espécies de *Bacillus* Cohn 1872, *Streptomyces* Waksman e Henrici 1943, *Rhizobium* Frank 1889; emend Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr e Sawada 2001a; *Bradyrhizobium*; *Acetobacter* Beijerinck 1898; *Herbaspirillum* Baldani, Baldani, Seldin & Döbereiner 1986; *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck & van Delden 1902) Conn 1942; *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes

1981 ex Burkholder 1950) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki e Arakawa 1993 (MARIANO et al., 2004).

Os efeitos benéficos, exercidos pelas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser conseguidos de forma direta através do estímulo ao crescimento da planta, principalmente na ausência dos microrganismos patogênicos, ou de forma indireta, através da proteção microbiológica (BERNADES, 2006).

A promoção direta do crescimento das plantas através das rizobactérias ocorre por meio da produção de ácido cianídrico, fitormônios, enzimas como a ACC-deaminas, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da absorção pelas raízes, entre outros. A promoção indireta do crescimento ocorre quando as rizobactérias atuam como agentes de controle biológico através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço,  $Fe^{+3}$  e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (MARIANO et al., 2004).

Apesar dessa divisão, o agente de controle biológico pode atuar através de mais de um mecanismo de interações antagonistas, aumentando assim suas chances de sucesso (BETTIOL, 1991).

## **2.4.1 Mecanismos de antagonismo das rizobactérias**

### **2.4.1.1 Antibiose**

É uma interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito nocivo sobre o outro (BETTIOL, 1991), inibindo a germinação e crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (SILVEIRA, 2001).

Na antibiose, são produzidos compostos bactericidas, fungicidas ou micostáticos e nematicidas. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo

peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros organismos (FRAVEL, 1988).

Uma grande variedade de antibióticos como fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrinas, tropolonas, piocianinas e 2,4 diacetilfloroglucinol têm sido isolados, principalmente de diferentes estirpes de *Pseudomonas* spp. do solo. Estes, junto com os sideróforos e o ácido hircociânico (HCN), parecem ser derivados do ácido corísmico, um intermediário da rota do ácido chiquímico. Alguns compostos, como as tropolonas, têm amplo espectro de ação, o que pode não ser desejável por eliminar outros organismos benéficos (ZAGO et al., 2000).

Segundo Brunetta (2006) a eficácia no controle de patógenos através dos antibióticos depende da suscetibilidade da população do patógeno-alvo. Assim, a introdução de diferentes isolados de rizobactérias que produzem antibióticos e que diferem no modo de ação, pode resultar num controle mais eficaz e reduzir a inconsistência do controle.

#### **2.4.1.2 Competição**

Competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação por alimento (nutrientes), espaço e oxigênio (BETTIOL, 1991).

A competição por espaço se dá, principalmente, pela ocupação dos sítios de colonização e a competição por nutrientes, pelos três elementos essenciais para a maioria dos patógenos: carbono, nitrogênio e ferro (PAULITZ, 1990). A competição por nutrientes fornecidos por raízes e exsudados de sementes ocorre na maior parte das interações entre bactérias e patógenos nas raízes, sendo responsável, pelo menos, por um pequeno coeficiente no biocontrole, observado pela introdução de bactérias (WELLER, 1988).

Rizobactérias com alta afinidade por ferro possuem a capacidade de inibir patógenos nos solos com a restrição desse nutriente (BRUNETTA, 2006). Segundo Buysens et al. (1996) bactérias do gênero *Pseudomonas* fluorescentes são os principais microrganismos que apresentam a competição

pelo  $\text{Fe}^{+3}$ , realizada por sideróforos. Além disso, grandes populações dessas bactérias estabelecidas em plantas e raízes podem permanecer parcialmente imersas em nutrientes na rizosfera (WELLER, 1988), restringindo, assim, a quantidade de carbono e nitrogênio disponíveis, tanto para a germinação dos esporos, quanto para os processos de pré-infecção radicular do agente patogênico (BRUNETTA, 2006).

A exclusão de nicho é potencialmente outro importante mecanismo de antagonismo de patógenos por rizobactérias. Espaços intercelulares e pontos de emergência das raízes laterais são locais favoráveis à colonização por muitas espécies de patógenos, devido à abundância em exsudados radiculares nessas áreas. A inoculação de plantas com rizobactérias supostamente previne ou reduz o estabelecimento de microrganismos deletérios nestes locais (SUSLOW, 1982).

#### **2.4.1.3 Indução de resistência sistêmica**

Quando uma rizobactéria coloniza a raiz, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizada atuam como eliciadores. Esses eliciadores agem como sinais e acionam genes codificadores de compostos de defesa, havendo, assim, a indução de resistência sistêmica (VAN LOON et al, 1998).

Indução de resistência sistêmica é o aumento da capacidade de defesa da planta contra diversos patógenos após estimulação apropriada, tornando-a mais resistente. A indução de resistência sistêmica está diretamente ligada a alterações bioquímicas e estruturais na planta (SOTTERO, 2003).

Vários processos bioquímicos como o aumento da produção das proteínas solúveis em ácido, acúmulo de fitoalexinas, lignificação, ácido salicílico em baixa concentração de ferro, estímulo da atividade da peroxidase e cadeia lateral antigênica-O de lipossacarídeos de membrana externa são propostos como mecanismos para indução de resistência sistêmica das plantas por rizobactérias (ZAGO et al., 2000).

Além da peroxidase, um significativo número de outras enzimas é associado à indução de resistência sistêmica, como por exemplo, fenilalanina-amônia-liase, lipoxigenase,  $\beta$ -1,3-glucanase e chitinase. O incremento na atividade e concentração dessas enzimas depende principalmente do agente indutor, mas também do genótipo da planta, das condições fisiológicas e do patógeno (SILVA et al., 2004).

Segundo Bernardes (2006) o desempenho da indução de resistência sistêmica pode variar com a idade da planta, o tratamento indutor, o intervalo de tempo entre o tratamento indutor e a inoculação do patógeno, os fatores ambientais, as condições de cultivo, o estado nutricional das plantas e as diferentes cultivares em relação ao indutor de resistência.

### 3 ARTIGO A: MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE *Sclerotium rolfsii* EM TOMATEIRO

#### 3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo e concentração de inóculo mais adequados para induzir a murcha-de-esclerócio, sem provocar ferimentos em plantas de tomateiro. Os tratamentos foram: 2, 4, 8 e 16 g de arroz colonizado.L<sup>-1</sup> incorporados ao solo; 2, 4, 6 e 8 escleródios ou discos de micélio depositados na superfície do solo. A deposição de discos de micélio e escleródios não ocasionaram a incidência da doença, entretanto, 8 g de arroz colonizado.L<sup>-1</sup> de solo demonstrou ser a concentração e o tipo de inóculo ideal para experimentos que visem a inoculação do patógeno sem incitação de ferimento.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, produção de inóculo, fungo de solo, murcha-de-esclerócio.

#### INOCULATION METHODS OF *Sclerotium rolfsii* IN TOMATO

#### 3.2 ABSTRACT

The objective of this work was to determinate the source and inoculum concentration suitable to induce southern blight symptoms in tomato plants, with no induced wounds. The performed treatments consisted by 2, 4, 8 and 16 g of colonized rice grains.L<sup>-1</sup> soil; 2, 4, 6 and 8 sclerotia or mycelium disks deposited in soil surface. Deposition of mycelium disks or sclerotia no result in disease, however, 8 g of colonized rice grains.L<sup>-1</sup> soil demonstrate to be the suitable concentration and inoculum source to induce southern blight with no wound induction in tomato plants.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, inoculum production, soilborne fungi, southern blight.



### 3.3 INTRODUÇÃO

A murcha-de-esclerócio causada pelo fungo de solo (LUTRELL, 1974) *Sclerotium rolfsii* Sacc. é uma doença de difícil controle (AGRIOS, 2005) que predomina em regiões de clima tropical e subtropical, e ocasiona tombamento, podridão radicular e murcha em mais de 500 espécies de plantas cultivadas no mundo (PUNJA, 1985).

Apesar da sua importância, a definição de um método para inoculação da doença, visando o estabelecimento das condições experimentais adequadas para expressão dos sintomas típicos, em condições mais próximas às que ocorrem em campo, não está estabelecida. Os métodos usados por diferentes autores têm sido utilizados sem critérios, havendo diversas variações nos procedimentos de inoculação. Alguns induzem condições altamente propícias à infecção pelo patógeno, como deposição de escleródios sobre ou junto às sementes (MATSUMOTO et al., 2000; BLUM et al., 2003), ou diretamente em ferimentos provocados nas plantas (DANTAS et al., 2002). Outros usam fontes ricas em carbono para promover a infestação do solo com inóculo do fungo, induzindo a ocorrência da doença sem causar ferimentos (FALCÃO et al., 2005; FLORES-MOCTEZUMA et al., 2006) e a deposição de discos de micélio diretamente no colo da planta (PRATT e ROWE, 2002). Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar qual o tipo e concentração de inóculo mais adequados para induzir a murcha-de-esclerócio, sem provocar ferimentos em plantas de tomateiro.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de maio a junho de 2007, no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação, com temperatura controlada a  $\pm 28$  °C, na Embrapa Roraima, Boa Vista, RR, Brasil.

Para ajustar a concentração de inóculo ideal para causar o máximo de incidência de doença, foram utilizados grãos de arroz colonizados, escleródios e discos de micélio. Como padrão, foi usado o isolado de *S. rolfsii* 258, obtido do pimentão e mantido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Roraima.

Grãos de arroz beneficiados foram submersos em água destilada por duas horas e em seguida autoclavados a 120 °C durante 20 min, segundo metodologia adaptada de Serra e Silva (2005). Posteriormente, foram distribuídos sobre colônias de *S. rolfsii*, crescidas em placas de Petri, com meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), durante sete dias em incubadora a  $\pm 25$  °C, em regime de fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias, os grãos já se encontravam colonizados em sua totalidade.

A produção dos escleródios e discos de micélio foi feita mediante o cultivo do patógeno, por meio de discos de micélio de 0,5 cm em placas de Petri com BDA, durante sete dias em incubadora a  $\pm 25$  °C, em regime de fotoperíodo de 12 horas. Os escleródios foram retirados das colônias e transferidos para placas de Petri esterilizadas. Já as colônias do fungo foram mantidas nas placas para, posteriormente, serem retirados os discos de micélio.

Mudas de tomateiro da cv. Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor com substrato Plantmax<sup>®</sup>, sendo transplantadas com raiz nua para vasos plásticos de 0,5 L, contendo solo esterilizado quando apresentavam duas folhas compostas.

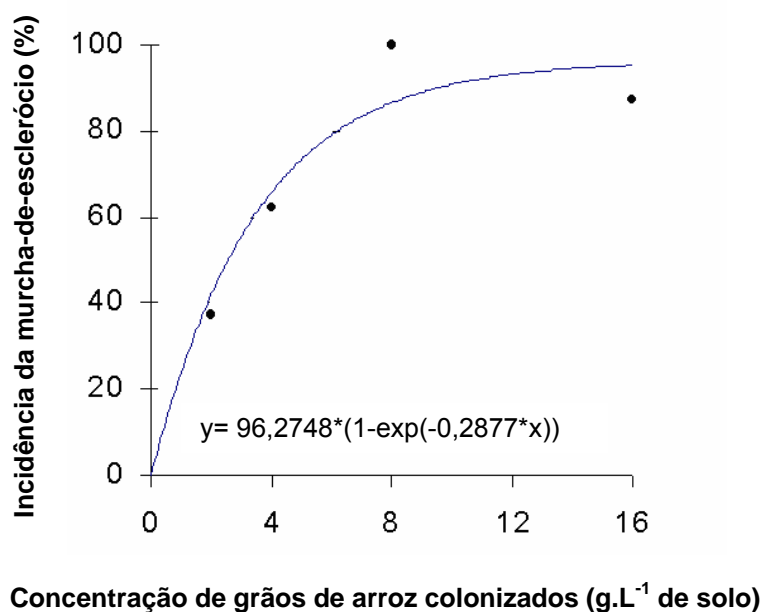
A infestação do solo com escleródios e discos de micélio foi feita depositando-se os propágulos sobre a superfície do substrato a um centímetro da planta, com 2, 4, 6 ou 8 propágulos por tratamento. Os grãos de arroz colonizados foram incorporados e homogeneizados ao solo antes do transplante das mudas, nas concentrações de 2, 4, 8 ou 16 g.L<sup>-1</sup> de solo, por

tratamento. Foram utilizadas oito plantas por tratamento e as testemunhas foram constituídas por discos de BDA e grãos de arroz não colonizados. Após a infestação, o solo foi irrigado uma vez ao dia.

As avaliações foram realizadas diariamente até 14 dias após a inoculação. As variáveis avaliadas foram: incidência de plantas com sintomas aos 14 dias após a infestação do solo e período de incubação. Os resultados foram analisados por análise de regressão (MADDEN et al., 2007) utilizando-se os pacotes estatísticos SigmaPlot 8.02 e Microsoft Excel 2000.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos em que houve incidência da doença foram os inoculados com arroz beneficiado. Os experimentos com a deposição de discos de micélio e escleródios foram repetidos, mantendo-se os resultados de insucesso destes propágulos como fonte de inóculo para as condições experimentais. A incidência da doença em função da concentração de inóculo no solo foi ajustada ao modelo monomolecular (HARTMAN et al., 1999), segundo a equação:  $y = 96,2748 * (1 - \exp(-0,2877 * x))$ , com  $R^2 = 0,96$  (Figura 3.5.1). Verifica-se que a partir da concentração de inóculo de  $8 \text{ g.L}^{-1}$  há uma tendência de estabilização da curva, atingindo o valor máximo de incidência da doença.



**Figura 3.5.1** - Incidência da murcha-de-esclerócio em função da concentração de grãos de arroz colonizados.

A comparação das dissimilaridades estatísticas das retas realizada por teste t (NUTTER Jr., 1997; MADDEN et al., 2007), demonstrou diferenças entre os valores de intercepto. Este parâmetro indica a estimativa da incidência inicial da doença. Na Tabela 3.5.1 observa-se que as concentrações de inóculo de 8 g e 16 g de arroz colonizado.L<sup>-1</sup> de solo, proporcionaram intensidade de

doença inicial superior à 2 g.L<sup>-1</sup>. Logo, esta concentração demanda maior período para que uma epidemia se inicie. Para o coeficiente angular da reta, que corresponde à taxa de progresso da doença (MADDEN et al., 2007), observa-se que há diferença estatística entre os valores das concentrações de 8 e 2 g de inóculo.L<sup>-1</sup>de solo (Tabela 3.5.1). Portanto, a concentração de inóculo de 8 g.L<sup>-1</sup> apresenta incidência maior em um mesmo período de tempo, quando comparado à 2 g.L<sup>-1</sup>e, por conseguinte, uma maior taxa de progresso da doença.

**Tabela 3.5.1** - Comparação das dissimilaridades estatísticas das retas realizada por teste t para os valores de intercepto e do coeficiente angular da reta.

Concentrações de inóculo	Intercepto			Coeficiente angular da reta		
	2 g.L <sup>-1</sup>	4 g.L <sup>-1</sup>	8 g.L <sup>-1</sup>	2 g.L <sup>-1</sup>	4 g.L <sup>-1</sup>	8 g.L <sup>-1</sup>
2 g.L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-
4 g.L <sup>-1</sup>	-1,70	-	-	1,73	-	-
8 g.L <sup>-1</sup>	2,60*	0,93	-	2,98*	-1,21	-
16 g.L <sup>-1</sup>	3,33*	0,93	-0,17	2,03	0,017	1,33

\* Valores de t calculado acompanhados de asterisco diferem estatisticamente a  $p \leq 0,05$ .

Os dados da incidência da doença em função da concentração de inóculo, aos 14 dias após a infestação do solo, demonstra que existe uma tendência em se atingir o máximo da incidência da doença em concentrações de inóculo a partir de 8 g.L<sup>-1</sup> de solo, corroborando com os dados observados nas análises de regressão linear.

Os resultados para o uso de arroz colonizado como substrato para inoculação de *S. rolfsii* podem ser comparados com os obtidos por Falcão et al. (2005), que verificaram que 5 g de arroz colonizado.kg<sup>-1</sup> de solo foi um dos substratos mais eficientes para avaliar a intensidade da murcha-de-esclerócio em soja, acarretando em 100% de mortalidade. Entretanto, isso não foi verificado quando utilizadas 4 g de arroz colonizado.kg<sup>-1</sup> de solo, para avaliar a incidência em tomateiro. Essa concentração ocasionou 60% de mortalidade após 14 dias de inoculação.

Matsumoto et al. (2000) e Blum et al. (2003) verificaram que dois escleródios, junto e sobre sementes de feijoeiro, proporcionaram incidência da doença, variando entre de 51 a 72% e de 12 a 94%, respectivamente. Dantas et al. (2002) constataram que 10 escleródios sobre o colo de feijoeiro levemente ferido foram suficientes para causar a doença. Pratt e Rowe (2002) constataram que a deposição de discos de micélio diretamente no colo da planta causou entre 60% e 61% de mortalidade em plantas de alfafa, três a quatro semanas após a inoculação. Porém, em tomateiro, quando usadas às concentrações de dois a oito escleródios ou discos de micélio.  $\text{kg}^{-1}$  de solo, não houve ocorrência da doença após duas semanas de inoculação, demonstrando uma discordância com os resultados obtidos por Matsumoto et al. (2000), Dantas et al. (2002), Pratt e Rowe (2002) e Blum et al. (2003).

Resultados obtidos para a influência de discos de micélio na incidência murcha-de-esclerócio do tomateiro mostraram-se semelhantes aos observados em soja, por Falcão et al. (2005). Em ambos os experimentos, não houve mortalidade de plantas após 14 dias de inoculação, indicando que as concentrações e o tipo de inóculo não são os mais adequados para avaliar a incidência da doença nas duas culturas estudadas. Além disso, Falcão et al. (2005) indicaram o uso de arroz como substrato para o cultivo de *S. rolfsii* e veiculação de inóculo para infestação de solo, demonstrando uma concordância com os resultados obtidos neste trabalho, no qual o arroz beneficiado foi o único substrato de cultivo que proporcionou a produção de inóculo e a incidência da doença no tomateiro, sem causar ferimentos nas plantas.

### 3.6 CONCLUSÕES

A inoculação de plantas de tomateiro, sem ferimentos com discos de micélio e escleródios, não constitui um método de inoculação que promova incidência da murcha-de-esclerócio em tomateiro.

A infestação do solo com grãos de arroz colonizados com *S. rolfsii* é um método indicado para experimentos que visem a inoculação do patógeno, sem causar ferimentos em plantas de tomateiro, a partir da concentração de 8 g de arroz colonizado.L<sup>-1</sup> de solo.

## 4 ARTIGO B: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO (*Sclerotium rolfsii*) EM TOMATEIRO

### 4.1 RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram selecionar, dentre 274 isolados de rizobactérias, agentes de biocontrole da murcha-de-esclerócio, sem efeito deletério no crescimento de plantas de tomateiro, e verificar a relação da supressão da difusão de ácido oxálico e do mecanismo de antibiose com a capacidade de controle. Seis ciclos de seleção massal *in vivo* foram realizados, e os melhores isolados foram reavaliados em três experimentos com maior número de repetições, sendo selecionadas as rizobactérias que promoveram menor severidade da doença, maior altura e matéria seca de plantas. O isolado 38291 destacou-se entre os demais, pela maior redução na severidade da doença, em todas as etapas de seleção, e por restringir o desenvolvimento do patógeno por antibiose.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, antibiose, ácido oxálico, seleção massal.

### SELECTION OF RHIZOBACTERIA TO THE BIOLOGICAL CONTROL OF SOUTHERN BLIGHT (*Sclerotium rolfsii*) IN TOMATO

### 4.2 ABSTRACT

The objective of this work was select through 274 rhizobacteria isolates, biocontrol agents of southern blight with no deleterial effect in plant growth, and to verify the relationship of oxalic acid diffusion and antibiosis with the capacity of control. Six steps of bulk selection *in vivo* were performed, and the selected isolates were evaluated three times with more replies, resulting in the selection of rhizobacteria that promoted reduction of disease severity and highest growth of plants. The isolate 38291 outstand the others, in largest reduction of disease severity, in all selection steps, and restrict the pathogen growth through antibiosis mechanism.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, antibiosis, oxalic acid, mass selection.



### 4.3 INTRODUÇÃO

Há muito se sabe que certas bactérias, quando aplicadas às sementes, solo, ou material de propagação, podem suprimir doenças de solo e promover o crescimento das plantas cultivadas (THOMASHOW, 1996), e ainda reduzir ou substituir o uso de produtos químicos sintéticos, na produção de alimentos (FREITAS e AGUILAR-VILDOSO, 2004). Esses agentes de controle biológico que, em geral, são autóctones da rizosfera, são denominados de rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (THOMASHOW, 1996).

As rizobactérias promotoras de crescimento das plantas utilizam diferentes mecanismos para supressão de fitopatógenos. Entre esses mecanismos, está incluída a competição por nutrientes e espaço, antibiose através de metabólitos antimicrobianos e produção de sideróforos (RAMAMOORTHY et al., 2001). De todos esses mecanismos, a antibiose talvez seja o mais amplamente conhecido (PAPAVIZAS e LUMSDEN, 1980) e o mais utilizado pelas rizobactérias no controle de fitopatógenos (GLICK e BASHAN, 1997). É através dessa forma específica de antagonismo que muitas rizobactérias são capazes de reduzir ou prevenir a germinação de propágulos fúngicos; ou inibir o crescimento após a germinação (PAPAVIZAS e LUMSDEN, 1980). Ainda, segundo Fravel (1988) em baixas concentrações, os antibióticos produzidos por rizobactérias, também são deletérios a outras atividades metabólicas de outros organismos.

O uso da antibiose como critério de seleção de antagonistas é considerado por alguns autores um dos principais problemas na seleção de agentes de controle biológico (FRAVEL, 1988; WELLER, 1988; BAKER, 1968), já que muitos dos candidatos a agentes de controle, obtidos por meio de testes de antibiose, podem não apresentar bom desempenho em ensaios de casa de vegetação e campo (MARIANO, 1993). Além disso, a seleção baseada somente no mecanismo de antibiose, pode não detectar outros mecanismos cruciais para o sucesso do controle *in vivo*, como a competição por nutrientes ou nichos ecológicos, habilidade de colonizar e sobreviver na rizosfera do hospedeiro (BETTIOL, 1991). Apesar das restrições, os estudos realizados *in vitro* apresentam-se como um passo importante para conhecer o

comportamento e prováveis mecanismos de ação dos biocontroladores, frente aos patógenos desafiantes (STEINER e SHONBECK, 1995). Em função disso, são ainda bastante utilizados por vários autores, como um dos critérios para detecção de potenciais agentes de controle biológico das diversas doenças de plantas (ALIYE et al., 2008; SILVA et al., 2008; RAN et al., 2005; SUSILO, 2004; AYSAN et al., 2003; HALFELD-VIEIRA, 2002; WILLIAMS e ASHER, 1996).

Uma outra alternativa que pode ser viável é detectar microrganismos que possam interferir em fases importantes durante o processo de infecção do patógeno. Para *S. rolfsii*, a interferência na difusão do ácido oxálico é um processo que, em tese, pode influenciar no controle deste patógeno, já que este metabólito se combina com o cálcio, presente no tecido do hospedeiro, e propicia a ação de enzimas pectolíticas, responsáveis pela degradação dos tecidos (DEACON, 1997).

Devido à dificuldade no controle da murcha-de-esclerócio do tomateiro, principalmente devido à sua grande gama de hospedeiros, formação de estruturas de resistência que permanecem no solo (PUNJA, 1985) e pouca eficiência do uso de fungicidas, o controle biológico pode ser uma alternativa viável por meio da busca por agentes eficazes ao controle dessa doença. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram selecionar, dentre 274 isolados de rizobactérias, agentes de biocontrole da murcha-de-esclerócio, sem efeito deletério no crescimento de plantas de tomateiro, e verificar a relação da supressão da difusão de ácido oxálico e do mecanismo de antibiose com a capacidade de controle.

## **4.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.4.1 Coletas de plantas de tomateiro**

As plantas de tomateiro foram coletadas em plantios caseiros e comerciais de diferentes municípios do estado de Roraima, recolhendo-se em média cinco plantas por área cultivada, em pelo menos seis períodos de coleta. Após a coleta, as plantas foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, onde foi realizada a eliminação da parte aérea da planta e a retirada do excesso de solo das raízes através de agitação manual. Em seguida, foi realizado o corte e a pesagem de um grama de raiz de cada uma das plantas coletadas, para o isolamento das rizobactérias.

### **4.4.2 Isolamento das rizobactérias**

As amostras de raízes, provenientes das plantas de tomateiro, foram colocadas em Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo 50 ml de solução salina (0,85% de NaCl) estéril e submetidas a agitação em incubadora por 15 min para obtenção da população bacteriana.

Após a agitação, 500 µl das suspensões bacterianas foram pipetados em tubos de ensaio, contendo 4,5 ml de solução salina, até a diluição em série  $10^{-6}$ , sendo depositados 100 µl das amostras obtidas em cada uma das três últimas diluições em uma placa de Petri, contendo meio de cultura 523 (KADO e HESKETT, 1970), espalhando-se com alça de Drigalski sobre a superfície do meio.

As placas foram mantidas em incubadora a  $\pm 25$  °C, em fotoperíodo de 12 horas, para obtenção de culturas puras cujo fator de diluição permita o crescimento de colônias isoladas. Após o crescimento, foram selecionadas colônias morfológicamente distintas, sendo transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura 523. Com o isolamento das rizobactérias, foram

realizados os testes de antagonismo *in vitro* e controle da doença em condições de casa de vegetação.

#### **4.4.3 Testes de antibiose e supressão da difusão do ácido oxálico**

Os 274 isolados de rizobactérias obtidos foram testados em meio de cultura 523 + azul de bromotimol a 0,005% (adaptado de STEADMAN et al., 1994), semeando-se quatro das bactérias isoladas nas extremidades da placa de Petri e um disco de micélio de *S. rolfsii* de 0,5 cm no centro. Em seguida, foi observada a capacidade das rizobactérias em reduzir o crescimento micelial e em alcalinizar o meio de cultura, restringindo a difusão do ácido oxálico, evidenciado por uma coloração amarela. Este teste foi repetido somente com as rizobactérias que mostraram efeito inibitório no crescimento micelial de *S. rolfsii* ou que foram capazes de alcalinizar o meio. Posteriormente, todas as rizobactérias testadas *in vitro* foram avaliadas em casa de vegetação.

#### **4.4.4 Seleção massal**

Para a realização do experimento, sementes de tomateiro cv. Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células, contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>. Quando as mudas apresentaram duas folhas compostas, foram transplantadas para copos plásticos descartáveis de 0,5 L, contendo solo artificialmente infestado com 4 g de arroz colonizado com o patógeno.

Imediatamente após a infestação do solo, foi realizada a deposição de 50 ml da suspensão bacteriana, ajustada em absorbância a 540 nm ( $A_{540}$ ), igual a 0,3 de uma das rizobactérias a serem testadas sobre a superfície do substrato em cada grupo de três plantas. Para a testemunha, ao invés da incorporação de uma suspensão bacteriana foram adicionados 50 ml de água.

Foi testado um total de 274 isolados de rizobactérias obtidas de diferentes áreas de cultivo de tomateiro, em pelo menos seis ciclos de seleção,

utilizando-se, em média, de quarenta a sessenta isolados por ciclo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi representada por uma planta de tomateiro cv. Santa Clara, com duas folhas compostas, transplantadas para vasos independentes.

As avaliações foram realizadas até 14 dias após a infestação do solo, em que somente os tratamentos em que não foi observada incidência da doença nas três repetições, mantendo-se uma maior altura das plantas, tiveram suas respectivas rizobactérias selecionadas.

A análise dos dados da altura da plantas foi realizada através do programa Sistema de Análise Estatística e Genética (S.A.E.G-5.0), efetuando-se a análise de variância e a comparação das médias, utilizando-se o teste de Tukey e Scott-Knott no nível de 5% de probabilidade.

#### **4.4.5 Confirmação da efetividade das rizobactérias selecionadas**

Para confirmar a efetividade das rizobactérias selecionadas na seleção massal, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com dez repetições para cada tratamento, em que cada repetição foi representada por três plantas de tomateiro cv. Santa Clara, com duas folhas compostas em expansão.

As mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 1,0 L contendo solo infestado com 8 g de arroz colonizado com *S. rolfsii*. Após a infestação do solo, foi realizada a deposição de 100 ml da suspensão bacteriana, ajustada em absorbância a 540 nm ( $A_{540}$ ), igual a 0,3 de uma das rizobactérias a serem testadas sobre o substrato. Na testemunha, foi realizada a deposição de 100 mL de água destilada sobre solo infestado com o patógeno.

Para avaliar a severidade da doença, foi utilizada uma escala de notas com cinco graus, adaptada de Fery e Dukes Sr. (2002) e Blum et al. (2003), onde 1= plantas sem sintomas; 2= plantas com escurecimento do coleto; 3= plantas com estrangulamento do coleto, porém ainda viva; 4= plantas com estrangulamento e crescimento fúngico no coleto, porém ainda viva; 5= planta

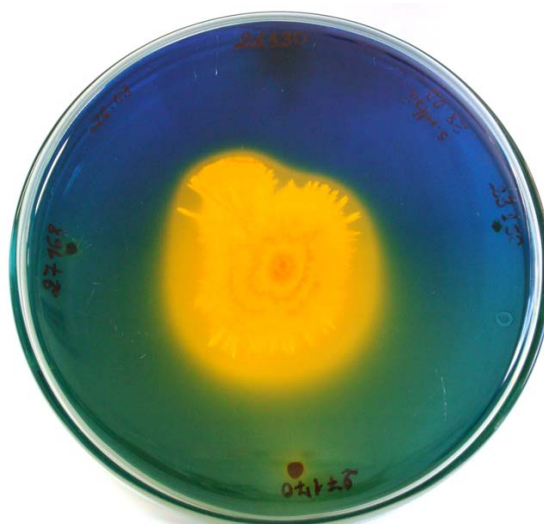
morta. Os valores de severidade da doença, segundo a escala descritiva, foram transformados para valores quantitativos, utilizando-se o índice de McKinney (1923). Foram estimados a área abaixo da curva do progresso de doença (AACPD), a taxa de progresso da doença, a severidade inicial da doença, altura e matéria seca de plantas. Todas as variáveis foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade por meio do comando proc GLM utilizando-se o programa SAS, versão 9. O experimento foi repetido três vezes.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de antagonismo *in vitro*, apenas 54 de 274 rizobactérias testadas apresentaram redução do crescimento micelial de *S. rolfsii*, sugerindo que a inibição do crescimento fúngico ocorreu, provavelmente, pela produção de compostos antimicrobianos (Figura 4.5.1). Destes 54 isolados, doze também promoveram a supressão da difusão do ácido oxálico, através da alcalinização do meio de cultura (Figura 4.5.2). Contudo, nenhum desses doze isolados conseguiu apresentar redução da severidade da doença em casa de vegetação.



**Figura 4.5.1** - Redução do crescimento micelial de *S. rolfsii* por rizobactérias.



**Figura 4.5.2** - Supressão da difusão do ácido oxálico por rizobactérias.

Na seleção massal, apenas 35 das 274 rizobactérias testadas, foram pré-selecionadas. Quando comparados quanto à promoção de crescimento do tomateiro, apenas 13 (217, 218, 539, 829, 18108, 18109, 28181, 29199, 31223, 32238, 33282, 38291 e 41296) dos 35 isolados selecionados *in vivo*, quanto à redução da incidência da murcha-de-esclerócio, também apresentaram as maiores médias de altura de plantas, sendo os mesmos reservados para os testes de confirmação de efetividade.

Os resultados dos testes de confirmação da efetividade das

rizobactérias selecionadas, quanto à severidade da doença, estão presentes na Tabela 4.5.1. Os valores médios apresentados foram obtidos eliminando-se os dois valores extremos de cada variável. As variáveis: severidade inicial da doença, severidade final e AACPD apresentaram, nos três experimentos de confirmação, os menores coeficientes de variação (entre 25 e 40%). Por outro lado, a taxa de progresso da doença apresentou coeficiente de variação acima de 54%, indicando não ser um parâmetro adequado para avaliar o desempenho de diferentes isolados de rizobactérias quanto à redução da severidade da murcha-de-esclerócio.

A partir das variáveis utilizadas para avaliar a severidade da doença, foi possível observar que dos treze isolados, obtidos na fase de seleção massal, somente cinco apresentaram capacidade de controle da doença e sua eficiência em mais de uma etapa de confirmação (Tabela 4.5.1).

Quando se comparam os valores obtidos nas etapas de confirmação, verifica-se que apenas o isolado 38291 foi capaz de manter em todos os ensaios uma tendência em reduzir os níveis de severidade da doença. Dentre os isolados avaliados, 38291 foi o único que também restringiu o crescimento do patógeno em meio de cultura, através do mecanismo de antibiose. No entanto, o mesmo não suprimiu a difusão do ácido oxálico. Outros dois isolados, 31223 e 41296, apresentaram desempenho semelhante ao obtido pelo isolado 38291, no controle do patógeno desafiante. Ambos foram capazes de reduzir a severidade a níveis similares aos observados para o isolado 38291; entretanto, somente em duas etapas de confirmação. Porém, não conseguiram reduzir com o mesmo desempenho a severidade inicial da doença. Os demais isolados, 32238 e 33282 também demonstraram capacidade em controlar a doença, já que em duas etapas de confirmação reduziram tanto a severidade quanto o período para surgimento dos sintomas da doença.

Apesar dos isolados selecionados evidenciarem capacidade de controlar a murcha-de-esclerócio, deve-se considerar que as condições experimentais não permitiram que estes expressassem seu total potencial no controle da doença, pois as plantas foram colonizadas imediatamente no momento do transplante em substrato contaminado. Os resultados obtidos podem ser otimizados utilizando-se a microbiolização de sementes, em que há



um maior período para que as rizobactérias colonizem as plantas, atuando com maior eficiência.

**Tabela 4.5.1** - Valores médios da severidade inicial da doença, severidade final e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) em plantas de tomateiro colonizadas por diferentes isolados de rizobactérias.

Isolado	1ª Etapa de Confirmação			2ª Etapa de Confirmação			3ª Etapa de Confirmação		
	Severidade inicial	Severidade final (18 DAIS*)	AACPD	Severidade inicial	Severidade final (22 DAIS)	AACPD	Severidade inicial	Severidade final (18 DAIS)	AACPD
29199	42,59 a	69,99 a	11469 a	33,53 abcd	59,16 abcde	13784 abc	21,10 abc	38,33 bc	5407 bc
829	33,51 ab	67,50 ab	10724 ab	19,96 cd	33,33 e	8074 c	28,50 abc	58,35 abc	8822 abc
31223	36,83 ab	66,66 ab	10494 ab	15,71 d	34,16 e	7675 c	23,23 abc	36,66 c	5336 bc
18108	33,70 ab	65,00 abc	10271 abc	19,62 cd	33,33 e	8048 c	34,81 a	71,66 a	10593 a
18109	35,09 ab	53,33 abcd	8820 abcd	36,35 abc	66,66 abcd	15799 ab	28,03 abc	51,67 abc	7488 abc
218	34,70 ab	53,33 abcd	8534 abcd	49,71 a	83,33 a	19653 a	27,22 abc	54,15 abc	7982 abc
539	35,82 ab	51,66 abcd	8322 abcd	42,34 ab	69,16 abcd	16323 ab	19,21 bc	48,35 abc	6504 abc
41296	30,40 ab	50,00 abcd	8144 abcd	16,09 d	33,33 e	7907 c	21,53 abc	27,50 c	4119 c
Testemunha	26,28 b	41,66 bcd	6189 cd	41,36 ab	67,49 abcd	15628 ab	25,77 abc	51,66 abc	7436 abc
217	25,20 b	41,66 bcd	6526 bcd	39,33 abc	69,99 abc	16385 ab	19,31 bc	51,67 abc	7172 abc
28181	24,52 b	38,33 cd	5980 cd	43,34 ab	79,99 ab	19115 a	28,98 abc	58,32 abc	8618 abc
<b>38291</b>	<b>25,38 b</b>	<b>36,66 d</b>	<b>5867 d</b>	<b>30,10 abcd</b>	<b>40,83 cde</b>	<b>9854 bc</b>	<b>18,51 c</b>	<b>35,01 c</b>	<b>4892 bc</b>
32238	26,99 b	33,33 d	5549 d	32,03 abcd	51,66 bcde	11093 bc	29,83 abc	55,82 abc	8630 abc
33282	24,59 b	31,66 d	5006 d	28,35 bcd	40,00 de	9437 bc	33,23 ab	69,17 ab	9759 ab
Coeficiente de Variação (%)	25,74	31,77	31,23	35,76	31,35	33,92	32,09	36,99	40,67

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*DAIS= Dias após a infestação do solo.

Segundo Weller (1988) nem sempre existe correlação entre a capacidade de uma bactéria inibir um patógeno *in vitro* e controlar a doença. Isolados que produzem zonas de inibição em meio de cultura, nem sempre são os melhores agentes no controle biológico. De acordo com Barker (1968), esta inexistência de correlação se deve à inativação dos antibióticos produzidos no solo por uma série de processos, como adsorção em argila e húmus, degradação microbiológicas e instabilidade devido ao pH. Esta inativação também pode explicar a ineficiência da supressão da difusão do ácido oxálico em solo, pelas rizobactérias, já que esta capacidade foi detectada nos ensaios *in vitro*.

Essas afirmações se baseiam no fato de que vários autores relatam a ausência de correlação entre a antibiose e a seleção de agentes de controle biológico *in vivo*, afirmando que a seleção baseada apenas em testes *in vitro* não é adequada. Silva et al. (2008) visando determinar os possíveis mecanismos de ação de agentes biocontroladores de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, verificaram que de seis bactérias testadas, apenas um isolado se destacou, inibindo o crescimento de todos os isolados do patógeno *in vitro*. Contudo, a maior capacidade de biocontrole não foi conferida pelo mesmo isolado. Halfeld-Vieira (2002) avaliando o efeito de compostos produzidos em meio de cultura por bactérias do filoplano do tomateiro sobre *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas vesicatoria*, verificou que somente dois de dez antagonistas selecionados *in vivo* foram capazes de inibir o desenvolvimento desses patógenos *in vitro*. Também, Aysan et al. (2003) estudando o uso de antagonistas para o controle de *Erwinia chrysanthemi*, agente causal da podridão mole do tomateiro, verificaram que dois isolados eficientes contra a bactéria em ensaios *in vitro* não reduziram o desenvolvimento dos sintomas em fatias de batata e em plantas de tomateiro testadas em casa de vegetação. Em outro exemplo, Williams e Asher (1996) observaram que todos os isolados de rizobactérias testados contra *Pythium ultimum* e *Aphanomyces cochlioides* não apresentaram correlação entre o grau de inibição no meio de cultura e a supressão da doença em mudas de beterraba. Do mesmo modo, Ran et al. (2005) não encontraram correlações entre a atividade antagônica de *Pseudomonas* spp. *in vitro* e biocontrole de murcha bacteriana em *Eucalyptus*

*in vivo*.

Contudo, os resultados indicam que a antibiose promovida pelo isolado 38291 deve ser um mecanismo importante no controle da murcha-de-esclerócio, já que este foi, dentre os selecionados, o único capaz de restringir o desenvolvimento do patógeno *in vitro* e de reduzir com maior repetibilidade a severidade da doença.

Outros autores também observaram esta mesma tendência para diferentes patossistemas. Susilo (2004) avaliando o potencial de rizobactérias como promotoras de crescimento do tomateiro e agentes de controle biológico da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), verificou que cinco rizobactérias demonstraram atividade antagonica contra o patógeno através da produção de antibióticos e sideróforos. Também reduziram significativamente a severidade e a incidência da doença quando comparados à testemunha, demonstrando que rizobactérias com antagonismo detectado *in vitro* podem ser consideradas como agentes potenciais para supressão de patógenos.

Um fato a ser considerado é que *S. rolfsii* nem sempre está fisicamente em contato com o tecido hospedeiro na fase de pré-penetração. Logo, possivelmente, os compostos microbianos produzidos por essa rizobactéria *in vitro* podem ter suprimido o crescimento do patógeno no solo, impedindo ou retardando o processo de infecção.

Em relação à promoção do crescimento de plantas, embora existam diversos exemplos de bactérias capazes de promover simultaneamente o controle de doenças e crescimento (ALIYE et al. 2008; SUSILO, 2004), as variáveis utilizadas para avaliar o desempenho dos treze isolados sobre o tomateiro, não permitiram observar influência dessas rizobactérias, tanto em incrementos de altura quanto no aumento quantitativo nos teores de matéria seca das plantas. Verificou-se, também, que nenhum dos isolados selecionados diferiram da testemunha em relação à altura e matéria seca das plantas, nas etapas de confirmação (Tabela 4.5.2).

Portanto, verifica-se que nenhuma das rizobactérias apresentou capacidade de atuar como promotor de crescimento do tomateiro. Porém, por outro lado, também não apresentaram efeito deletério às plantas. Da mesma forma, Silva et al. (2008a) observaram em um dos ensaios realizados que a altura das plantas não diferiu entre os isolados testados e a testemunha.

**Tabela 4.5.2** - Valores médios da Altura, da Matéria Seca Total (M. S. Total), Matéria Seca da Raiz (M. S. Raiz) e Matéria Seca da Parte Área (M. S. Parte Aérea) de plantas de tomateiro inoculadas com diferentes isolados de rizobactérias.

Isolado	1º Etapa de Confirmação				2º Etapa de Confirmação				3º Etapa de Confirmação			
	Altura	M. S. Total*	M. S. Raiz*	M. S. Parte Área*	Altura	M. S. Total	M. S. Raiz	M. S. Parte Área	Altura	M. S. Total	M. S. Raiz	M. S. Parte Área
31223	18,55 a	1,14 a	0,79 a	1,08 a	23,54 abc	1,16 a	0,78 a	1,12 a	19,02 ab	0,99 a	0,79 a	0,93 a
32238	17,76 a	1,02 a	0,76 a	0,98 a	19,39 c	0,95 a	0,75 a	0,91 a	16,27 ab	0,92 a	0,74 a	0,89 a
<b>Testemunha</b>	<b>17,67 a</b>	<b>1,02 a</b>	<b>0,76 a</b>	<b>0,98 a</b>	<b>22,24 abc</b>	<b>1,06 a</b>	<b>0,77 a</b>	<b>1,01 a</b>	<b>17,22 ab</b>	<b>1,01 a</b>	<b>0,76 a</b>	<b>0,97 a</b>
29199	17,26 a	1,09 a	0,77 a	1,04 a	24,89 abc	1,23 a	0,81 a	1,17 a	16,49 ab	0,90 a	0,77 a	0,84 a
41296	17,23 a	1,03 a	0,77 a	0,98 a	23,22 abc	1,04 a	0,76 a	1,00 a	19,68 a	0,95 a	0,76 a	0,91 a
18108	16,97 a	1,09 a	0,76 a	1,05 a	25,20 abc	1,19 a	0,80 a	1,13 a	14,07 b	0,94 a	0,76 a	0,90 a
33282	16,87 a	0,98 a	0,75 a	0,95 a	20,12 bc	0,99 a	0,75 a	0,95 a	17,12 ab	0,99 a	0,77 a	0,95 a
218	16,60 a	0,99 a	0,76 a	0,96 a	20,45 bc	1,05 a	0,77 a	1,00 a	16,48 ab	1,02 a	0,77 a	0,97 a
38291	16,46 a	0,95 a	0,75 a	0,92 a	20,96 bc	0,99 a	0,77 a	0,95 a	16,89 ab	0,93 a	0,75 a	0,89 a
217	16,39 a	0,98 a	0,75 a	0,95 a	22,44 abc	1,09 a	0,77 a	1,04 a	14,03 b	0,87 a	0,75 a	0,83 a
829	16,32 a	1,00 a	0,75 a	0,97 a	30,87 a	1,45 a	0,88 a	1,35 a	19,23 ab	1,09 a	0,82 a	1,01 a
18109	15,81 a	1,02 a	0,76 a	0,98 a	26,43 ab	1,33 a	0,83 a	1,25 a	15,95 ab	0,86 a	0,74 a	0,83 a
28181	15,55 a	0,94 a	0,75 a	0,91 a	25,72 abc	1,27 a	0,82 a	1,20 a	17,91 ab	1,05 a	0,80 a	0,98 a
539	15,01 a	0,94 a	0,73 a	0,92 a	23,17 abc	1,22 a	0,84 a	1,14 a	14,84 b	0,87 a	0,75 a	0,83 a
Coefficiente de Variação (%)	25,74	17,43	5,36	16,04	24,74	19,76	7,36	18,27	29,22	19,84	7,42	17,75

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*Para efeito de análise, os valores originais foram transformados em raiz ( $x+0,5$ ).

De acordo com El Hassni et al. (2007) a utilização de agentes biológicos para ativar os mecanismos de defesa da planta contra os agentes patogênicos constitui uma alternativa ecológica aos pesticidas repetidamente utilizados para controle de doenças de plantas, além de ser uma estratégia significativa contra os patógenos de solo, para os quais medidas de controle são muito restritas ou quase indisponíveis.

Os resultados obtidos para o isolado 38291 podem ser considerados promissores, já que essa rizobactéria demonstrou tanto em laboratório quanto em casa de vegetação ter potencial para ser utilizada como agente de biocontrole da murcha-de-esclerócio do tomateiro, quando comparada aos isolados 31223, 32238, 33282 e 41296. Contudo, ainda há a necessidade de estudo do efeito desses isolados sobre a murcha-de-esclerócio em condições de campo.

## 4.6 CONCLUSÕES

Nenhuma rizobactéria que suprimiu a difusão de ácido oxálico nos testes *in vitro* foi capaz de controlar a murcha-de-esclerócio em casa de vegetação.

O isolado 38291 foi o único que apresentou efeito de antibiose detectável *in vitro* e estabilidade no controle da murcha-de-esclerócio em casa de vegetação, sugerindo que a antibiose seja um importante mecanismo no biocontrole da doença em tomateiro.

Os isolados 31223, 32238, 33282 e 4129 promoveram apenas controle *in vivo* da murcha-de-esclerócio.

Nenhum dos cinco isolados com potencial a agentes de biocontrole contra a murcha-de-esclerócio apresentaram a capacidade de promover crescimento nem efeito deletério em plantas de tomateiro.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

As mais altas taxas de incidência da murcha-de-esclerócio em plantas de tomateiro, sem indução de ferimento, e os menores períodos para início da epidemia, foram observados quando inoculadas com  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de grãos de arroz colonizados com *S. rolfsii*.

Discos de micélio e escleródios não demonstraram eficiência na indução da murcha-de-esclerócio, quando inoculados em plantas de tomateiro sem ferimentos.

Não houve relação entre a supressão da difusão de ácido oxálico e a capacidade de controle da murcha-de-esclerócio, pois nenhuma rizobactéria que apresentou esse mecanismo em meio de cultura controlou a doença em casa de vegetação.

O isolado 38291 foi o único que apresentou efeito de antibiose detectável *in vitro* e estabilidade no controle da murcha-de-esclerócio em casa de vegetação, sugerindo que a antibiose seja um importante mecanismo no biocontrole da doença em tomateiro.

Os isolados 31223, 32238, 33282 e 4129 promoveram apenas controle *in vivo* da murcha-de-esclerócio.

Nenhum dos cinco isolados com potencial a agentes de biocontrole contra a murcha-de-esclerócio apresentaram a capacidade de promover crescimento nem efeito deletério em plantas de tomateiro.



## REFERÊNCIAS

ABO ELLIL, A. H. A. **Oxidative stress in relation to lipid peroxidation, sclerotial development and melanin production by *Sclerotium rolfsii***. Journal of Phytopathology, Berlin, v.147, 1999, p.561-566. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1439-0434.1999.00431.x>>. Acesso em: 30 mai. 2007.

ADANDONON, A. **Damping-off and stem rot of cowpea in Benin caused by *Sclerotium rolfsii***. Pretoria, 2004, 154 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - University of Pretoria.

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 5.ed, 2005, p.385-614.

ALIYE, N.; FININSA, C.; HISKIAS, Y. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). **Biological Control**,v.47, l.3, p. 282-288, 2008.

ALMEIDA, A. M. R.; ABDELNOOR, R. V.; CALVO, E. S.; TESSNMAN, D.; YORINORI, J. T. **Genotypic diversity among brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii***. Journal of Phytopathology, Berlin, v.149, 2001, p.493-502. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1439-0434.2001.00651.x>>. Acesso em: 30 mai. 2007.

ALVARENGA, M. A. R. Capítulo 1 - Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. 1ª edição. Lavras: Editora UFLA, 2004, p.15-16.

AYSAN, Y.; KARATAS A.; CINAR O. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. **Crop Protection**, v.22, p.807-811, 2003.

BARKER, R. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.6, p.263-294, 1968.

BERNARDES, F. de S. **Rizobactérias na indução de sistência em cultivos hidropônicos**. Campinas, 2006, 58 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas.

BETTIOL, W. Capítulo 1 - Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991, p.01-05.

BLUM, L. E. B.; PRADA, A.; MEDEIROS, É. A. A.; AMARANTE, C. V. T. do.

Temperatura, luminosidade e meio de cultura afetando a produção de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, n.1, 2002, p.1-7. Disponível em: <[http://www.cav.udesc.br/rca/arquivos/2002/n1/Blum2002n1\\_1.pdf](http://www.cav.udesc.br/rca/arquivos/2002/n1/Blum2002n1_1.pdf)>. Acesso em: 01 mai. 2007.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEIDT, F. R. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n.1, p.96-100, jan-fev, 2003.

BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus* spp.** Viçosa, 2006, 57 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa.

BUYSENS, S.; HEUGENS, K.; POPPER, J.; HOFTE, M. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of Pythium-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.865-871, 1996.

CARDOSO, J. E. Podridão do colo. In: CARDOSO, J. E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, Documentos, 30, 1990, p. 15-17.

CARVALHO, G. A.; REIS, P. R.; MORAES, J. C.; FUINI, L. C.; ROCHA, L. C. D.; GOUSSAIN, M. M. **Efeitos de alguns inseticidas utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. Ciênc. Agrotec, Lavras, v.26, n.6, 2002, nov-dez, p.1160-1166. Disponível em: <[http://www.editora.ufla.br/revista/26\\_6/art06.pdf](http://www.editora.ufla.br/revista/26_6/art06.pdf)>. Acesso em: 25 ago. 2007.

CARVALHO, G. A.; PARRA, J. R. P.; BAPTISTA, G. C. **Efeito de produtos fitossanitários utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879)**. Ciênc. Agrotec, Lavras, v.27, n.2, 2003, mar-abr, p.295-304. Disponível em: <[http://www.editora.ufla.br/revista/27\\_2/art07.pdf](http://www.editora.ufla.br/revista/27_2/art07.pdf)>. Acesso em: 25 ago. 2007.

CHAVES, K. C.; COSTA, J. L. da S. Influência do método de inoculação e da quantidade de inóculo de *Sclerotium rolfsii* na severidade da podridão do colo do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.4, p.298-302, 1999.

CORTEZI, D.; MITUTI, T.; LOPES, I. O. N.; CATTELAN, A. J.; GALERANI, P. R.; TORRES, E.; ALMEIDA, Á. M. R. Efeito da palha, da umidade e da esterilização do solo na produção de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2005, p.35-39.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; COELHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. **Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii***.

Fitopatologia Brasileira, v.27, n.5, p.528-531, set-out, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v27n5/14062.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2007.

DEACON, J. W. **Modern mycology**. 3. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1997. 303p.

EL HASSNI, M.; EL HADRAMI, A.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M.; AIT BARKA, E.; EL HADRAMI, I. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, p.224-234, 2007.

EMBRAPA RONDÔNIA. Doenças do feijoeiro. In: EMBRAPA RONDÔNIA. **Cultivo do feijão comum em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Sistema de Produção, 8, 2005. Disponível em: <<http://sistemadeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodeFeijaoComumRO/doencas.htm>>. Acesso em: 24 mai. 2007.

FALCÃO, J.V.; ORILI, F.P.; ÁVILA, Z. R. de; MELLO, S.C.M. de. **Estabelecimento de metodologia para contaminação de solo com propágulos dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, e expressão de doença em soja**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, comunicado técnico 135, p.1-9, 2005. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot135.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2007.

FAO. **FAOSTAT**. 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 20 fev. 2009.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, D. J. H. da; BARBOSA, J. G.; PEDROSA, A. W. **Cultivo sucessivo de plantas de tomate oriundas de sementes e propagação vegetativa em sistema hidropônico**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.42, n.7, p.1013-1019, jul, 2007. Disponível em: <<http://webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab2007/07/42n07a14.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2007.

FERREIRA, S. A.; BOLEY, R. A. ***Sclerotium rolfsii***. University of Hawaii at Manoa, Department of Plant Pathology, CTARH, 1992. Disponível em: <[http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s\\_rolfs.htm](http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_rolfs.htm)>. Acesso em: 09 jun. 2007.

FERY, R.; DUKES SR, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: yield-loss estimates and sources of resistance. **Crop Protection**, v. 21, p.403–408, 2002.

FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; MONTES-BELMONT, R.; JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; NAVA-JUÁREZ, R. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. **Crop Protection**, v.25, p.195-201, 2006.

FRAVEL, D. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.75-91, 1988.

FREITAS, S.S.; AGUILAR VILDOSO, C.I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biothechnology Advances**, v.15, n.2, p.353-378, 1997.

GOMES, E. P. **Viabilidade de mudanças tecnológicas na irrigação da tomaticultura de mesa**. Campinas, 2005, 95 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

HALFELD VIEIRA, B. de A. Antibiose como mecanismo de biocontrole por bactérias de filoplano de tomateiro e sua inadequação como critério de seleção de antagonistas. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. **Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Viçosa, 2002, p.23-38. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

HALFELD VIEIRA, B. de A.; NECHET, K. de L.; MATTIONI, J. A. M. **Doenças do tomateiro no Estado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, Documentos, 3, 2006, p.6. Disponível em: <[http://www.cpafrf.embrap.br/index.php/cpafrf/publica\\_es/documentos/doen\\_as\\_do\\_tomateiro\\_no\\_estado\\_de\\_roraima](http://www.cpafrf.embrap.br/index.php/cpafrf/publica_es/documentos/doen_as_do_tomateiro_no_estado_de_roraima)>. Acesso em: 02 ago. 2007.

HARTMAN, J.R.; PARISI, L.; BAUTRAIS, P. Effect of leaf wetness duration, temperature, and conidial inoculum dose on apple scab infection. **Plant Disease**, v.86, p.531-534, 1999.

IBGE. **Banco de dados agregados: Tabela 1618 - Produção, área plantada e área colhida por ano da safra e produto**. 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=1&i=P>>. Acesso em: 09 mar. 2009.

INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO. **Podridão branca: *Sclerotium rolfsii* Sacc.** [s.d]. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/vegetais/beterraba/podridao\\_branca.htm](http://www.biologico.sp.gov.br/vegetais/beterraba/podridao_branca.htm)>. Acesso em: 01 mai. 2007.

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

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J. W.; REDDY, M. S. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v.31, p.91–

100, 2006.

KRONKA, A. Z. **Cancro bacteriano do tomateiro: Metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químico sobre o controle**. Piracicaba, 2004, 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. dos. Murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*). In: LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. dos. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.26, 1994.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. de. Murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*). In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. de. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.39-40, 2005.

LUTRELL, E. S. Parasitism of fungi on vascular plants. **Mycologia**. New York, 1974, v.66, n.1, p.1-15.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.4, p.1-50, 1996.

LUZ, F. J. de F.; SABOYA, R. de C. C.; PEREIRA, P. R. V. da S.; ALVES, A. B. **O cultivo do tomate em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, Circular Técnica, 6, 2002, p.01. Disponível em: <[http://www.cpafr.embrap.br/index.php/cpafr/publica\\_es/circular\\_t\\_cnica/o\\_cultivo\\_do\\_tomate\\_em\\_roraima](http://www.cpafr.embrap.br/index.php/cpafr/publica_es/circular_t_cnica/o_cultivo_do_tomate_em_roraima)>. Acesso em: 25 ago. 2007.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. APS: St. Paul, 2007. 421p.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, C. W. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Gráfica Editora Pe. Berthier, v.1, p.369-409, 1993.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, v.1, 91, 2004. Disponível em: <<http://www.pgfitop.ufrpe.br/publicacoes/rosabacrev.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2007.

MARTINS, M. V. V.; SILVEIRA, S. F. da; CARVALHO, A. J. C. de; SOUZA, E. F. de. Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares, em campos dos Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 421-424, dezembro, 2003.

MATSUMOTO, M. N.; HOMECHIN, M. MASSOLA, N. S.; KAMIKOGA, A. T. M. Efeito do substrato de cultivo na produção de esclerócios e na patogenicidade

- de *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.91-94, 2000.
- MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Jour. Agric. Res. Washington**, v.26, p.195-219, 1923.
- NAIKA, S.; JEUDE, J. v. L. de; GOFFAU, M. de; HILMI, M.; VAM DAM, B. Introdução: Uma descrição sucinta do tomate. In: NAIKA, S.; JEUDE, J. v. L. de; GOFFAU, M. de; HILMI, M.; VAM DAM, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006, p.6-9.
- NUTTER JR., F.W. Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. **Crop Protection**. v.16, p.603-618, 1997.
- PAPAVIZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D. Biological control of soilborne fungal propagules. **Ann. Rev. Phytopathol**, v.18, p.389-413, 1980.
- PAULITZ, T.C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: BAKER, R. R. (Ed.). **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Liss, 1990. p.713-724.
- PRATT, R.G; ROWE, D.E. Enhanced resistance to *Sclerotium rolfsii* in populations of alfalfa selected for quantitative resistance to *Sclerotinia trifoliorum*. **Phytopathology**, v.92, n.2, p. 204-209, 2002.
- PUNJA, Z. K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual review of Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p. 97-127, 1985.
- 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, p.1-11, 2001.
- RAN, L.X.; LIUB, C.Y.; WUB, G.J.; van LOONA, L.C.; BAKKERA, P.A.H.M. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by *fluorescent Pseudomonas* spp. in China. **Biological Control**, v.32, p.111-120, 2005.
- SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.1, p.61-66, jan-fev, 2005.
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. da S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, 29, p.288-295, 2004.
- SILVA, E. G. da; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C.; FARIAS, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por

bactérias. **Revista Ceres**, v.55, 5, p.377-383, 2008.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M. de; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P. da; CASTRO, A. M. dos S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciênc. Agrotec.**, v.32, n.4, p.1062-1072, 2008a.

SILVEIRA, E. B. da. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001, p.71-100.

SOTTERO, A. N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. Campinas, 2003, 47 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas, 2003.

STEADMAN, J.R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.16, p. 68-70, 1994.

STEINER, U.; SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, RK (Ed.) **Induced resistance to disease in plants - development in plant pathology**. Kluwer Academic Pub: Dordrech, 182p., 1995.

SUSILO, B. H. **Isolation e screening of rhizobacteria and their potential as plant growth promoters and biological control agents for bacterial wilt of tomato**. Universiti Putra Malaysia, 2004, 126p. Dissertação (Mestrado em Ciência Agrícola) - Universiti Putra Malaysia.

SUSLOW, T. V. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. H. (Ed.). **Phytopathogenic Prokaryotes**. London: Academic, v.1, 1982, p.187-223.

THOMASHOW, L. S. Biological control of plant root pathogens. **Biotechnology**, v.7, p.343-347, 1996.

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

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.

WILLIAMS, G.E.; ASHER, M.J.C. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlidioides* on sugar-beet seedlings. **Crop Protection**, v.15, n.5, p.479-486, 1996.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. ***Pseudonomas spp.***

**Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documentos, 127, 2000, p.04. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/srviços/download/doc.127.pdf>>. Acesso em: 01 mai. 2007.