

Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro

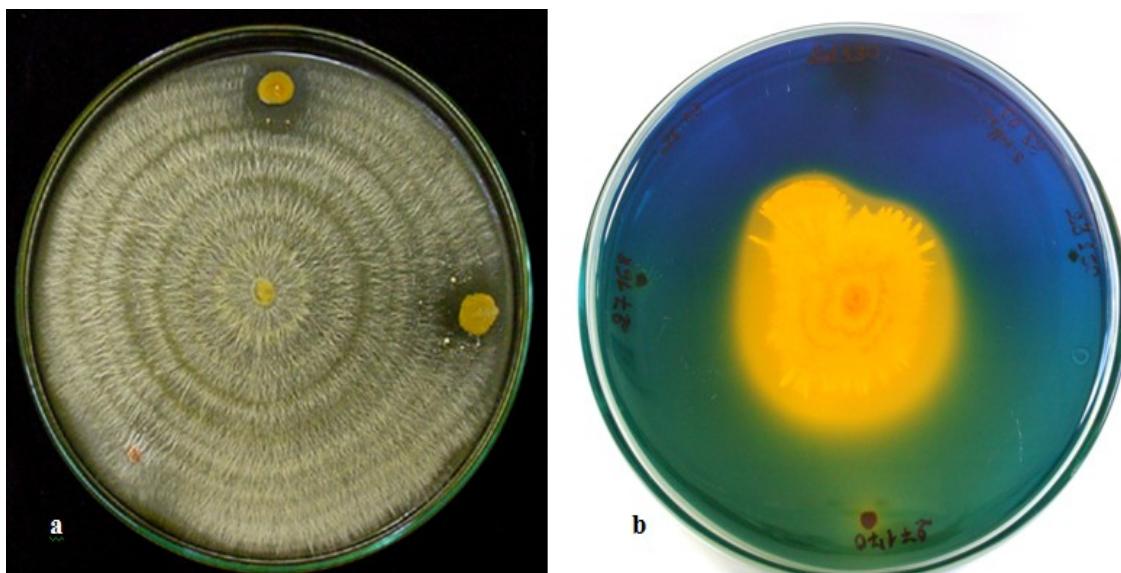


Foto:Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira

ISSN 1981 - 6103
Agosto, 2009

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Roraima
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 15

Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira
Rosianne Nara Thomé Barbosa
Kátia de Lima Nechet
Jean Luiz Simões de Araújo

*Parte da dissertação de mestrado da segunda autora apresentada à Universidade Federal de Roraima.

Boa Vista, RR
2009

Exemplares desta publicação podem ser obtidos na:

Embrapa Roraima

Rod. BR-174 Km 08 - Distrito Industrial Boa Vista-RR

Caixa Postal 133.

69301-970 - Boa Vista - RR

Telex: (095) 3626.7018

e-mail: sac@cpafrr.embrapa.br

www.cpfrr.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Marcelo Francia Arco-Verde

Secretário-Executivo: Newton de Lucena Costa

Membros: Aloísio de Alcântara Vilarinho

Jane Maria Franco de Oliveira

Paulo Sérgio Ribeiro de Mattos

Ramayana Menezes Braga

Ranyse Barbosa Querino da Silva

Revisão Gramatical: Paulo Roberto Tremacoldi

Normalização Bibliográfica: Jeana Garcia Beltrão Macieira

Editoração Eletrônica: Vera Lúcia Alvarenga Rosendo

1ª edição

1ª impressão (2009): 300

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP

Embrapa Roraima

Halfeld-Vieira ,Bernardo de Almeida.

Seleção de Rizobactérias visando ao Controle Biológico de *Sclerotium Rolfsii* em Tomateiro. / Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, Rosianne Nara Thomé Barbosa, Kátia de Lima Nechet, Jean Luiz Simões de Araújo. – Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009.

29 p. (Embrapa Roraima. Documentos, 15).

1. Tomateiro. 2. Controle Biológico. 3. Rizobactérias. I. Barbosa, Rosianne Nara Thomé. II. Nechet, Kátia de Lima . III. Araújo, Jean Luiz Simões de. IV. Título.

CDD: 635.642

Autores

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira

Doutor, Pesquisador A, Embrapa Roraima, BR-174 Km 08 / Distrito Industrial Boa Vista/RR / Caixa Postal 133/69301-970 /Boa Vista/RR,
halfeld@cpafrr.embrapa.br

Rosianne Nara Thomé Barbosa

Mestre, Engenheira Agrônoma da Agência de Defesa Agropecuária do Estado de Roraima (ADERR), Rua General Penha Brasil, 1123, São Francisco, 69305-130, rosiannethome@click21.com.br

Kátia de Lima Nechet

Doutor, Pesquisador A, Embrapa Roraima, BR-174 Km 08 / Distrito Industrial Boa Vista/RR / Caixa Postal 133/69301-970 /Boa Vista/RR,
katia@cpafrr.embrapa.br

Jean Luiz Simões de Araújo

Doutor, Pesquisador A/Rodovia BR 465, km 7/Seropédica/RJ/23890-000, jean@cnpab.embrapa.br

SUMÁRIO

Introdução.....	06
Material e Métodos.....	06
Resultados e Discussão	08
Conclusões.....	22
Referências.....	23

Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira
Rosianne Nara Thomé Barbosa
Kátia de Lima Nechet
Jean Luiz Simões de Araújo

Introdução

A presente publicação tem como finalidade documentar os resultados obtidos no projeto “Seleção de rizobactérias visando ao controle biológico de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro”, financiado pelo Macroprograma 3 – Agrofuturo (cód. 03.06.513.00) e CNPq Edital Universal, MCT/CNPq 15/2007, processo: 470433/2007-8, disponibilizando assim, a memória dos trabalhos realizados e os resultados obtidos.

O trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar, dentre 274 isolados de rizobactérias, aquelas capazes de promover 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. Em uma primeira etapa, foram realizados ajustes metodológicos para inoculação do patógeno sem a incitação de ferimentos em plantas de tomateiro, utilizando-se 2, 4, 8 e 16 g de arroz colonizado.L-1 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 274 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-1 de solo é a concentração e o tipo de inóculo ideaais 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, porém, sem atividade detectável in vitro.

PART I: AJUSTE DA CONCENTRAÇÃO E TIPO DE INÓCULO DE *Sclerotium rolfsii* PARA INDUÇÃO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO EM TOMATEIRO

1.1 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 ao estabelecimento das condições experimentais adequadas para expressão dos sintomas típicos em condições mais próximas às que ocorrem em campo não está bem estabelecido. 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., 2005) e a deposição de discos de micélio diretamente no colo da planta (PRATT; ROWE, 2002). Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar qual o tipo e a concentração de inóculo mais adequados para induzir a murcha-de-esclerócio, sem provocar ferimentos, em plantas de tomateiro.

1.2 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 $\pm 28^{\circ}\text{C}$, 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 de pimentão e mantido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Roraima.

7 Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

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 ±25 °C e em regime de fotoperíodo de 12 horas. Sete dias depois da incubação, 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 ±25 °C e 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 produzidas em bandejas de isopor com substrato Plantmax®, 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 1 cm 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⁻¹ de solo, por tratamento. Foram utilizadas 8 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. Os parâmetros avaliados 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.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os únicos 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 1.1). Verifica-se que a partir da concentração de inóculo de 8 g.L⁻¹ há uma tendência de estabilização da curva, atingindo o valor máximo de incidência da doença.

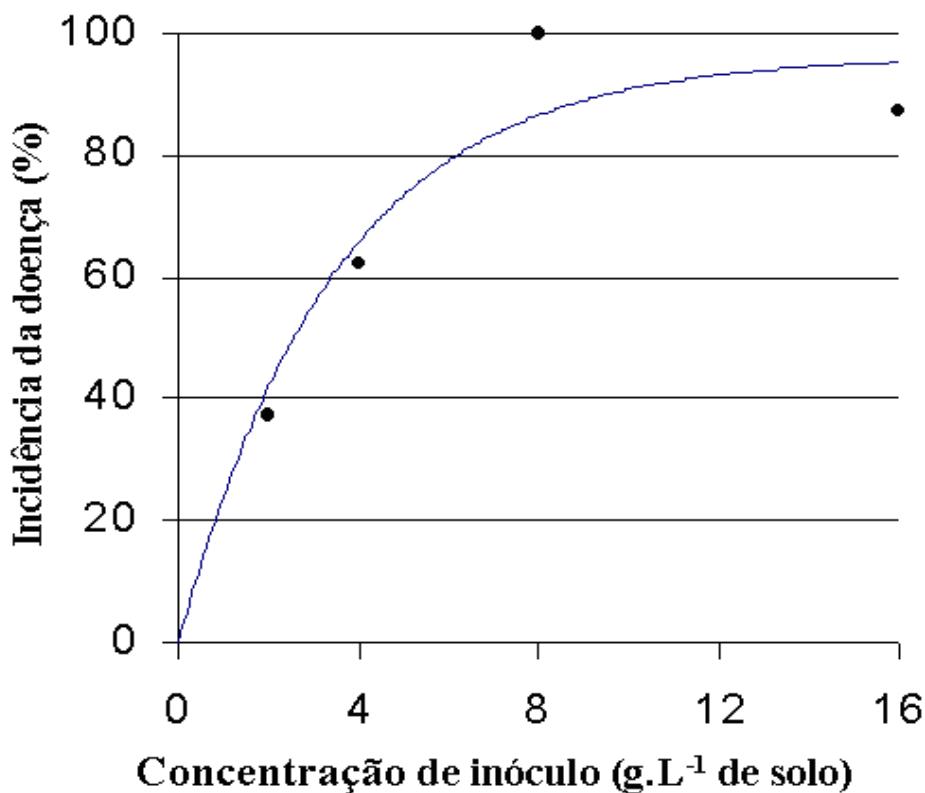


Fig. 1.1. Incidência da doença em função da concentração de inóculo.

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 1 observa-se que as concentrações de inóculo de 8 g e 16 g de arroz colonizado.L⁻¹ de solo proporcionaram intensidade de doença inicial superior a 2 g.L⁻¹, 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-

9 Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

1de solo (Tabela 1.1). Portanto, a concentração de inóculo de 8 g.L⁻¹ apresenta incidência maior em um mesmo período de tempo, quando comparada à de 2 g.L⁻¹e, por conseguinte, uma maior taxa de progresso da doença.

Tabela 1.1. 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 ⁻¹	4 g.L ⁻¹	8 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	4 g.L ⁻¹	8 g.L ⁻¹
2 g.L ⁻¹	-	-	-	-	-	-
4 g.L ⁻¹	-1,70	-	-	1,73	-	-
8 g.L ⁻¹	2,60*	0,93	-	2,98*	-1,21	-
16 g.L ⁻¹	3,33*	0,93	-0,17	2,03	0,017	1,33

* Valores de t calculados acompanhados de asterisco diferem estatisticamente a p£0,05.

Os dados da incidência da doença em função da concentração de inóculo aos 14 dias após a infestação do solo demonstram que existe uma tendência em se atingir o máximo da incidência da doença em concentrações de inóculo a partir de 8 g.L⁻¹ de solo, corroborando 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⁻¹ 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 é verificado quando utilizadas 4 g de arroz colonizado.kg⁻¹ 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 juntos 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. Porém, em tomateiro, quando usadas as concentrações de dois a oito escleródios kg⁻¹ de solo não houve ocorrência da doença, demonstrando uma discordância com os resultados obtidos por Matsumoto et al. (2000), Dantas et al. (2002) e Blum et al. (2003).

Resultados obtidos para a influência de discos de micélio na incidência de 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.

PARTE II: SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO EM TOMATEIRO.

2.1 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; 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, estão incluídos a competição por nutrientes e espaço, a antibiose através de metabólitos antimicrobianos e a produção de sideróforos (RAMAMOORTHY et al., 2001). De todos esses mecanismos, a antibiose talvez seja o mais amplamente conhecido (PAPAVIZAS; LUMSDEN, 1980) e o mais utilizado pelas rizobactérias no controle de fitopatógenos (GLICK; 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; LUMSDEN, 1980). Ainda, segundo Fravel (1988), em baixas concentrações, os antibióticos produzidos por rizobactérias também são deletérios a outras atividades metabólicas de outros organismos.

11 Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

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 e 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 se conhecer o comportamento e prováveis mecanismos de ação dos biocontroladores frente aos patógenos desafiantes (STEINER; 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; ASHER, 1996).

Uma outra alternativa que pode ser viável é detectar organismos que possam interferir em fases importantes durante o processo de infecção do patógeno. Para *Sclerotium 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).

Dada a 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 enfermidade. 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.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coletas de plantas de tomateiro

As plantas de tomateiro foram coletadas em plantios caseiros e comerciais de diferentes municípios 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.

2.2.2 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; HESKETT, 1970), espalhando-se com alça de Drigalski sobre a superfície do meio.

As placas foram mantidas em incubadora a ±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 (KADO; HESKETT, 1970). Com o isolamento das rizobactérias foram realizados os testes de antagonismo in vitro e controle da doença em condições de casa de vegetação.

2.2.3 Testes de antibiose e supressão da difusão do ácido oxálico

Os isolados de rizobactérias obtidos foram testados em meio de cultura 523 + azul de bromotimol a 0,005% (adaptado de STEADMAN et al., 1994), colocando-se um disco de micélio de *S. rolfsii* de 0,5 cm no centro da placa de Petri e, nas extremidades semeadas, quatro das bactérias isoladas. Foi observada a redução do crescimento micelial e a capacidade da rizobactéria em alcalinizar o meio de cultura, evidenciada pela difusão de

uma coloração azul, 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. Com a conclusão do experimento, todas as rizobactérias foram avaliadas em casa de vegetação.

2.2.4 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®. 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 (A540) 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, sendo cada repetição 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, e 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 das 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.

2.2.5 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 as avaliações, foram utilizados os parâmetros descritos abaixo. O primeiro foi a escala adaptada de Fery e Dukes Sr. (2002): 1= plantas sem sintomas; 2= plantas com escurecimento do coletor; 3= plantas com estrangulamento do coletor, porém ainda vivas; 4= plantas com estrangulamento e crescimento fúngico no coletor, porém ainda vivas; 5= plantas mortas. Para análise estatística, os valores de severidade da doença, segundo a escala descritiva, foram transformados para valores quantitativos utilizando-se o índice de McKinney (1923). Com a transformação dos dados calculou-se a área abaixo da curva do progresso de doença (AACPD), a taxa de progresso da doença e a severidade inicial da doença. Os demais parâmetros avaliados foram altura e massa 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.

2.2.6 Identificação molecular dos antagonistas selecionados

As células foram crescidas em meio líquido até a fase logarítmica, em seguida 2,0 mL do inóculo foi coletado e centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi imerso em N2 líquido (choque-térmico), ressuspensionado em 570 µL de T10E1+30µ L SDS 10% e incubado por uma hora sob breve agitação. A seguir, foram adicionados 100 µL de NaCl e as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Adicionaram-se 100 µL de CTAB/NaCL 10% seguido de homogeneização em vórtex por 15 segundos, incubando-se as amostras em

seguida sob agitação por cerca de 1 hora. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min, a 4°C; o sobrenadante foi coletado em um novo tubo, adiciou-se 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e incubou-se por 10 minutos sob agitação. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C por 15 minutos; o sobrenadante foi coletado e adicionou-se 1 volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:24:1), homogeneizando-se por inversão por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo e adicionou-se 1/10 volume de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 2 volumes de etanol 100%. As amostras precipitaram por 2 horas a -20°C e, em seguida, foram submetidas a centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. A esta etapa seguiu-se uma etapa de lavagem com 1 mL de EtOH 70%, misturando-se cuidadosamente por inversão. Realizou-se uma etapa de centrifugação a 9.600 rpm, por 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa de lavagem com etanol foi realizada duas vezes. Finalmente, o precipitado foi ressuspensido em 50 µL de T10E1 e estocado em freezer a -20°C.

Foram realizadas duas reações de PCR para cada uma das amostras da extração de DNA pelo método CTAB: 1 (33282), 2 (36291), 3 (44296), 4 (31223a) e 5 (32238). O material foi diluído 10X em H₂O PCR e a reação foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) Amp2 e 27f nas seguintes condições: 1 µL de DNA (1:10), 6 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL Amp2 (5 µM), 0,5 µL 27f (5 µM), 1,5 dNTP (10 mM), 0,25 Taq DNA polimerase 5U/µL (Fermentas life Sciences), 2,5 µL DMSO 50%, 5,0 Tampão KCl 10X (Fermentas life Sciences), 32,75 µL H₂O PCR, para um volume final de reação 50,00 µL.

Foi utilizado um Termociclador Eppendorf com o seguinte programa: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 Seg, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, e, finalmente, uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C, e mantidos até 4°C. Após o término da reação, 3,0 µL da reação de PCR do produto da reação foram utilizados para uma eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 02) para verificação da eficiência de amplificação. O produto de PCR foi, então, purificado utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification KitR (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático de DNA MegaBACE1000 com o kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare Cat N° US81090) e

os primers para o gene 16S rDNA, 27F, AMP2, U6, U3, U2, RU2, RU3, RU6, RU7 e 786F. Foram utilizados 200 ng do produto de PCR após purificação, utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification KitR (GE Healthcare). A sequência do 16S de cada bactéria foi montada utilizando os resultados das reações de sequenciamento e o programa PhredPhrap. Após a montagem, foi realizada uma análise de similaridade utilizando o programa BLAST e o banco de sequências não redundantes (NR) do NCBI.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de antagonismo in vitro, apenas 54 de 274 rizobactérias testadas apresentaram redução do crescimento micelial de *S. rolfsii* (Figura 2.1.a). Nesses testes, o antagonismo expressado por 33 desses isolados mostrou-se evidente em meio de cultura, sugerindo que a inibição do crescimento fúngico ocorreu, provavelmente, pela produção de compostos antimicrobianos. Destes 33 isolados, seis também promoveram a supressão da difusão do ácido oxálico, através da alcalinização do meio de cultura (Figura 2.1.b).

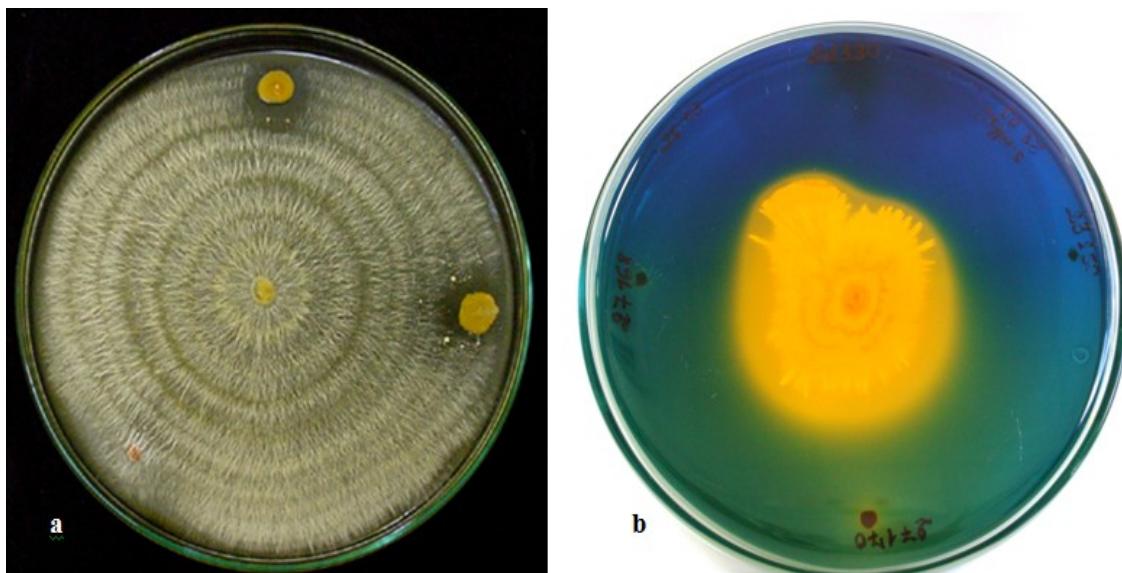


Fig. 2.1. Testes de antagonismo in vitro: a. Redução do crescimento micelial de *S. rolfsii* por antibiose; b. Supressão da difusão do ácido oxálico.

Na seleção massal, apenas 35 das 274 rizobactérias testadas foram pré-selecionadas. Quando comparados quanto à promoção de crescimento do tomateiro, apenas treze (217, 218, 539, 829, 18108, 18109, 28181, 29199, 31223, 32238, 33282, 38291 e 41296) dos 35 isolados selecionados in vivo 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 2.1. Os valores médios apresentados foram obtidos eliminando-se os dois valores extremos de cada variável. Os parâmetros severidade da doença no último dia de avaliação, a área abaixo da curva do progresso da doença e a severidade inicial da doença apresentaram nos três experimentos de confirmação os menores coeficientes de variação (entre 25 e 40). Já 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 dos parâmetros utilizados para avaliar a severidade da doença, foi possível observar que, dos treze isolados obtidos na fase de seleção massal, poucos apresentaram capacidade de controle da doença e de sua eficiência em mais de uma etapa de confirmação (Tabela 2.1).

Quando se comparam os valores obtidos nas etapas de confirmação, verifica-se que apenas o isolado 38291 foi capaz de manter sua efetividade no controle 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 supriu 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 demonstraram, de certo modo eficiência intermediária no controle da doença, já que em duas etapas de confirmação foram capazes de manter entre baixos e médios tanto os níveis de severidade quanto o período para surgimento dos sintomas da doença.

Tabela 2.1. Valores médios da severidade da doença no último dia de avaliação, área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e severidade inicial da doença em plantas de tomateiro colonizadas por diferentes isolados de rizobactérias.

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

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 microbiológica 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*, afirmindo 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 por este. 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 3829 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 antagônica 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-penetrção, 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.

A identificação dos isolados selecionados por sequenciamento do gene 16S rDNA, considerando as mais altas similaridades encontradas, foi a seguinte: 31223 - *Agrobacterium tumefaciens*, similaridade de 99%; *Rhizobium* sp., similaridade de 99%; 32238 - *Agrobacterium tumefaciens*, similaridade de 99%; *Rhizobium* sp., similaridade de 99%; 33282 - *Agrobacterium tumefaciens* similaridade de 94%; 41296 - *Devosia* sp., similaridade de 96%; 38291 - *Kluyvera ascorbata*, similaridade de 99%. Cabe destacar que estas identificações são comparativas, de acordo com sequências de bactérias já conhecidas e cujos dados estão disponibilizados na base de dados do NCBI.

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), os parâmetros utilizados 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. Nenhum dos isolados selecionados diferiu da testemunha em relação à altura e massa seca das plantas nas etapas de confirmação (Tabela 2.2).

Portanto, verifica-se que nenhuma das rizobactérias apresentou capacidade de atuar como promotora de crescimento do tomateiro, porém, 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.

21 Seleção de Rizobactérias Visando ao Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

Tabela 2.2. Valores médios da Altura, do Massa Seca Total (M. S. Total), Massa Seca da Raiz (M. S. Raiz) e Massa Seca da Parte Área (M. S. Parte Aérea) em presença de 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
Testemunha	17,67 a	1,02 a	0,76 a	0,98 a	22,24 abc	1,06 a	0,77 a	1,01 a	17,22 ab	1,01 a	0,76 a	0,97 a
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
CV (%)	25,74	17,43	5,36	16,04	24,74	19,76	7,36	18,27	29,22	19,84	7,42	17,75

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 com o uso de agentes de biocontrole geralmente não promovem total controle das doenças (Silva et al. 2008). 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, assim como os isolados 31223, 32238, 33282 e 41296. Contudo, ainda há a necessidade de se realizarem ensaios que visem à otimização da eficiência destes antagonistas como, por exemplo, por meio da microbiolização de sementes, que promove um período maior para colonização radicular pelos antagonistas, o que poderá aumentar seu êxito no controle da doença, já que os ensaios de seleção foram altamente favoráveis ao patógeno por proporcionarem uma alta densidade de inóculo e uma inoculação simultânea à aplicação do antagonista. Também, faz-se necessário realizar ensaios em campo naturalmente infestados para verificar sua eficiência nestas condições.

3. CONCLUSÕES

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 g.L⁻¹ de grãos de arroz colonizados com *Sclerotium rolfsii*.

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

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 controle da murcha-de-esclerócio, porém com menor estabilidade quando comparados ao isolado 38291.

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

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

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: University of Pretoria, 2004. Tese (Doutorado em Filosofia). University of Pretoria, 2004.

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, I.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.

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.

BERNARDES, F. de S. Rizobactérias na indução de sistênciam em cultivos hidropônicos. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, 2006.

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>. Acesso em: 01 mai. 2007.

24 Seleção de Rizobactérias Visando o Controle Biológico de *Sclerotium rolfsii* em Tomateiro*

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, 1, p.96-100, 2003.

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

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

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 1990. 531p.

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, v.26, n.6, 2002, p.1160-1166. Disponível em: <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 F1 e F2 em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Ciênc. Agrotec, v.27, n.2, 2003, p.295-304. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/revista/27_2/art07.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2007.

CARVALHO, G. A. de; ABREU, M. S. de; OLIVEIRA, D. F. de; RESENDE, M. L. V. de; ABREU, M. F. E. de. Efeito *in vitro* e *in vivo* de filtrados de rizobactérias sobre *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. do cafeeiro. Ciência e Agrotecnologia, v. 29, n. 3, p. 553-561, 2005.

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, 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.

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://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodeFeijaoComumRO/doencas.htm>>. Acesso em: 24 mai. 2007.

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.

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, v.42, n.7, 2007, p.1013-1019. 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>. 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.; NAVAJUÁREZ, 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, 2005.

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.

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

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.embrapa.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. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=1&i=P>>. Acesso em: 22 ago. 2007.

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>. 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.; KLOEPER, 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: Universidade de São Paulo, 2004. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo, 2004.

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.

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.

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

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.cpafrr.embrap.br/index.php/cpafrr/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. 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 Agronômica, v.1, 91, 2004. Disponível em: <<http://www.pgfitop.ufrpe.br/publicacoes/rosabacrev.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2007.

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.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documentos, 161, 2003, p. 27.

PAPAVIZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D. Biological control of soilborne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology, 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, 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.

RANA, 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, 2005.

SILVA, E. G. da; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C.; FARIA, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do crescimento 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. Ciência e Agrotecnologia, v.32, n.4, p.1062-1072, 2008a.

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

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: Instituto Agronômico de Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico 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. Dissertação (Mestre em Ciência Agrícola), 2004.

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

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 cochlioides* on sugar-beet seedlings. Crop Protection, v.15, n.5, p.479-486, 1996.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas 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/servicos/download/doc.127.pdf>>. Acesso em: 01 mai. 2007.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO

