

Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças de plantas

ISSN 0103-9865
Setembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 132

Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças de plantas

José Roberto Vieira Júnior
Cléberon de Freitas Fernandes
Alaerto Luiz Marcolan
Domingos Sávio G. da Silva
Hildebrando Antunes Júnior
Nidiane Dantas Reis

Porto Velho, RO
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO
Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléberon de Freitas Fernandes*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes-Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2009): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia

Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças das plantas / José Roberto Vieira Júnior ... [et al].-- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2009.

16 p. – (Documentos / Embrapa Rondonia, 0103-9865 ; 132)

1. Controle biológico. 2. Filoplano. 3. Agente de Biocontrole. 4. Biocontrole de fitopatógenos. I. Vieira Júnior, José Roberto. II. Fernandes, Cléberon de Freitas. III. Marcolan, Alaerto Luiz. IV. Silva, Domingos Sávio Gomes da. V. Antunes Júnior, Hildebrando. VI. Reis, Nidiane Dantas. VII. Título. VIII. Série.

CDD 632. 96

© Embrapa - 2009

Autores

José Roberto Vieira Júnior

Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, vieirajr@cpafro.embrapa.br

Cléberon de Freitas Fernandes

Farmacêutico, D.Sc. em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, cleberon@cpafro.embrapa.br

Alaerto Luiz Marcolan

Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, marcolan@cpafro.embrapa.br

Domingos Sávio G. da Silva

Assistente da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, domingos@cpafro.embrapa.br

Hildebrando Antunes Júnior

Graduando do curso de Agronomia da Faculdade Interamericana de Porto Velho (UNIRON), estagiário da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, hajuninho1217@hotmail.com

Nidiane Dantas Reis

Graduanda do curso de Farmácia das Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA), estagiária da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, nid_reis@hotmail.com

Sumário

Introdução.....	7
Fatores físicos e biológicos que governam a dinâmica das populações de microrganismos no filoplano.....	10
Métodos de obtenção de bactérias residentes de filoplano	11
Método de “imprinting” de folhas	11
Ultrasson	12
Agitação em solução salina e diluição seriada	13
Considerações finais	13
Referências	14

Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças de plantas

*José Roberto Vieira Júnior
Cléber de Freitas Fernandes
Alaerto Luiz Marcolan
Domingos Sávio Gomes da Silva
Hildebrando Antunes Júnior
Nidiane Dantas Reis*

Introdução

A população microbiana no filoplano de plantas é muito complexa em sua constituição e há enorme diversidade nos eventos e nas condições que equacionam sua dinâmica (KINKEL et al., 1996; KINKLE, 1997). Paralelamente, é considerado que o filoplano é um habitat comum para microrganismos, e muitos deles podem apresentar potencialidade como agentes de controle biológico de enfermidades (BAKER; COOK, 1974).

Entretanto, para se utilizar microrganismos como agentes de biocontrole, torna-se imprescindível o estudo das influências ambientais capazes de alterar o habitat em que os agentes de biocontrole devem se estabelecer. O sucesso do controle biológico de fitopatógenos de parte aérea depende em grande parte do conhecimento das características dos agentes biocontroladores. A filosfera ou filoplano (LAST, 1955; RUINEN, 1956) é um ambiente complexo, onde são encontrados basicamente três tipos de microrganismos: as leveduras, os fungos filamentosos e as bactérias (WINDELS; LINDOW, 1985), cada um com estratégias próprias de colonização e sobrevivência.

Este ambiente tem características muito particulares, pois sofre variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis (ANDREWS; HIRANO, 1991). O conjunto desses fatores faz com que diferentes populações microbianas neste habitat predominem em certos sítios específicos do filoplano, variando de acordo com as estações do ano ou estádios de desenvolvimento das folhas, já que condições de ambiente e a composição dos exsudatos foliares favorecem ou limitam o desenvolvimento de certas espécies (JACOB, 1997).

Um dos principais problemas do uso de residentes de filoplano para biocontrole de fitopatógenos advém de sua baixa capacidade de sobrevivência ou mesmo de sua capacidade de manter a população em alta densidade (ANDREWS; HIRANO, 1991; WINDELS; LINDOW, 1985). Muitas vezes, bons agentes de biocontrole, selecionados em casa de vegetação, não apresentam o mesmo potencial ao serem inoculados em condições de campo para promoverem o controle das enfermidades. O principal fator que compromete essa capacidade de sobrevivência é a instabilidade ambiental da filosfera (ANDREWS; HIRANO, 1991), que faz com que haja uma grande dificuldade no estabelecimento e manutenção de populações de antagonistas potencialmente promissoras, em condições de campo. Dessa forma, podemos concluir que, métodos de seleção que visem isolados capazes de se estabelecerem e manterem suas populações em situações desfavoráveis elevam as possibilidades de se deparar com um antagonista com características importantes para o seu estabelecimento no campo (WINDELS; LINDOW, 1985).

As bactérias utilizam basicamente dois tipos de estratégias para sobreviverem em ambientes de estresse, tolerância e escape. A primeira requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta, baixa umidade, além de outros, enquanto a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais (BEATTIE; LINDOW, 1995; BEATTIE; LINDOW, 1999).

A capacidade de competição no filoplano é maior quando existe uma sobreposição das exigências nutricionais do antagonista e do fitopatógeno, resultando em um baixo nível de coexistência entre os dois organismos, portanto quanto mais similares eles são, maior é o grau de sobreposição (WILSON; LINDOW, 1994a; WILSON; LINDOW, 1994b). Um exemplo prático é o trabalho de Cooksey (1988) que utilizou um mutante não patogênico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, conseguindo obter uma redução significativa na severidade da doença incitada pelo isolado patogênico.

Além de competir por sítios de alimentação e sobrevivência, postula-se que os residentes de filoplano possuam outras estratégias para promover o controle de fitopatógenos, tais como: produção de compostos antimicrobianos, como no exemplo em que Montesinos et al. (1996) constataram que alguns isolados de *Pseudomonas fluorescens* permitiram uma redução de até 51 % na incidência e 88 % na severidade da doença, no patossistema *Stemphylium vesicatorium* x *Pyrus communis*, o que foi atribuído à produção de compostos antifúngicos e efeitos de quimiotaxia durante a germinação dos conídios, demonstrando uma forte correlação entre o efeito da antibiose e a eficiência no controle.

Algumas bactérias são capazes de excretar metabólitos que exercem efeitos danosos a outros organismos, consistindo em um evento denominado antibiose (BETTIOL, 1991). Um exemplo prático é o do estudo de espécies de *Erwinia herbicola*, que revelaram sua capacidade em produzir antibióticos de amplo espectro, denominados herbicolinas, em que um isolado era capaz de produzir pelo menos dois tipos destes antibióticos, cada um com espectro antimicrobiano distinto. Um dos produtos purificados parcialmente, denominado herbicolina O, foi capaz de inibir o desenvolvimento de 13 espécies de bactérias, muitas de gêneros diferentes, enquanto a herbicolina I só foi capaz de inibir as espécies *Erwinia amylovora*, *Bacillus cereus* (um dos dois isolados testados) e *Staphylococcus aureus*, porém, a herbicolina O teve sua eficiência reduzida quando na presença do aminoácido L-histidina e inativada em condições de baixo pH, o que não aconteceu com a herbicolina I que somente teve sua atividade comprometida quando em condições alcalinas (ISHIMARU et al., 1988). Vieira Júnior et al. (2007b, 2007c) comprovaram o efeito de residentes de filoplano de maracujazeiro contra antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, via antibiose também.

Este exemplo demonstra claramente a importância de se realizar testes de antibiose *in vivo*, pois as condições de pH, umidade, temperatura, entre outros são capazes de reduzir ou até mesmo inibir os efeitos dos compostos antimicrobianos.

Outro mecanismo é a produção de sideróforos, que são compostos de baixo peso molecular com ação quelante sobre o ferro. Estes sideróforos são "reconhecidos" por proteínas receptoras que podem ser específicas ou não (MEYER et al., 1998), localizadas na membrana plasmática, que promovem o ingresso do complexo ferro-sideróforo na célula bacteriana (WELLER, 1988; MEYER et al., 1998).

Laine et al. (1996) estudaram o efeito que os sideróforos podem ter no desenvolvimento de certos organismos e verificaram que o crescimento de *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* e *Aspergillus niger* foi inibido por *P. chlororaphis* e *P. fluorescens*, porém um dos isolados de *P. chlororaphis* estimulou o desenvolvimento das espécies de *Fusarium* avaliadas, mas inibiu *Aspergillus niger*. Essa variação de resultados parece estar relacionada com a capacidade que

alguns organismos podem ter em utilizar também os sideróforos produzidos por bactérias (WELLER, 1988). Resultado semelhante foi observado por Vieira Júnior et al. (2007b) em maracujazeiro amarelo, contra antracnose.

Zhang e Yuen (2000), encontraram fortes evidências de que a produção de quitinase por *Stenotrophomonas maltophilia* (isolado C3) é um dos componentes envolvidos no controle de *Bipolaris sorokiniana*, capaz de inibir a germinação de esporos e o desenvolvimento da doença, enquanto mutantes, incapazes de produzir esta enzima, foram ineficientes. O isolado C3 excretou, além da quitinase *in vitro*, β -1,3-glucanase, proteases e lipase, compostos que segundo os autores, contribuem para a inibição do desenvolvimento do fungo.

Outro mecanismo possível de ocorrer trata-se da indução de resistência por microorganismos residentes na filosfera. Relatos detalhados são feitos por Schönbeck e Dehne, (1986) em relação a míldios pulverulentos, míldios inferiores e ferrugens. Filtrados de culturas contendo metabólitos produzidos por bactérias induziram respostas de resistência induzida em folhas de trigo contra míldio pulverulento. Repetidas aplicações em campos de cultivo diminuíram as perdas por *Erysiphe graminis* (DEHNE et al., 1984). O biocontrole por indução de resistência apresenta vantagens, pois uma vez induzida, não são necessárias altas populações do antagonista por um longo período de tempo. No entanto, parece que o envolvimento desse mecanismo na superfície da folha, muitas vezes parece estar envolvido apenas contra patógenos foliares do tipo necrotroficos (ELAD et al., 1994). Em tomateiro, Halfeld-Vieira et al (2006) conseguiram demonstrar que *Bacillus cereus*, um procarionta residente de filoplano autóctone da cultura era capaz de induzir resistência sistêmica quando pulverizado tanto no terço inferior quanto superior da planta, com o patógeno sendo pulverizado na região oposta. O mesmo foi observado por Vieira-Júnior e Romeiro (2007), quando se testou *B. cereus* isolado de feijoeiro contra o crestamento bacteriano da cultura.

Apesar de todos os aspectos citados anteriormente, tentativas de se utilizar residentes de filoplano como agentes de biocontrole continuam sendo realizadas (BETTIOL, 1991).

Bora et al. (1993) citam que vários residentes de filoplano como *Erwinia herbicola*, *Flavobacterium* sp., *Micrococcus luteus* e *Serratia marcescens* foram efetivos para o biocontrole mancha bacteriana da folha de feijão mungo (*Vigna radiata*) e que *E. herbicola* foi a mais eficiente de todas, quando aplicada 48 horas antes da inoculação com o patógeno desafiante (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* (Dye).

Pabitra et al. (1996) isolaram uma cultura de *B. subtilis* de filoplano de limoeiro capaz de inibir "in vitro" o crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* e de reduzir a incidência de cancro cítrico em 61,9 %, em experimentos de campo.

Krishnamurthy e Gnanamanickam, (1998) estudaram o uso de *Pseudomonas fluorescens* no controle da brusone do arroz causada pelo patógeno *Magnaporthe grisea* e verificaram que em condições de viveiro, o isolamento em estudo reduziu os sintomas em 68,5 % e em condições de campo, o mesmo antagonista proveu um controle da doença na ordem de 59,6 %.

Michereff et al. (1994), selecionaram residentes de filoplano de inhame visando o biocontrole da queima da folha causada por *Curvularia eragrostidis*. Os autores selecionaram como mais promissor um isolamento de *Bacillus subtilis* sendo capaz de reduzir em até 75 % a severidade da doença e com alta persistência na superfície da planta.

No laboratório de bacteriologia de plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, alguns trabalhos já foram realizados visando selecionar bactérias do filoplano para o controle de doenças de parte aérea de tomateiro (LEITE et al., 1998; CARRER FILHO et al., 1999), encontrando-se potenciais agentes de biocontrole, sendo dois isolados de

Pantoea agglomerans e um de *Cedecea davisae* (Romeiro-Comunicação pessoal). Porém, em ensaios de campo, estes se mostraram ineficientes em controlar *Phytophthora infestans*, indicando a necessidade de inclusão desse importante patógeno no programa de seleção de antagonistas (ROMEIRO et al., 2000)

Halfeld-Vieira et al. (2001) testaram um isolado de *Pseudomonas putida*, como agente potencial de biocontrole de *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans* do tomateiro, em condições de campo. Os autores demonstraram que o isolado pode atrasar o progresso de requeima, quando comparado com plantas que só receberam água. O mesmo pode ser observado para *A. solani*, com resultados comparáveis aos tratamentos com chlorothalonil. Macagnan et al. (2001) detectaram a atividade *in vitro* de compostos antifúngicos produzidos por residentes de filoplano para controle de *Crinipellis pernicioso*. A atividade antifúngica foi detectada, porém variou em função do ensaio realizado. Recentemente, procariotas residentes de filoplano de feijão foram selecionados por Vieira Júnior et al. (2004a; 2004b) para o controle da mancha angular do feijoeiro, da ferrugem e do crestamento bacteriano dentre outras doenças. Demonstrou-se também que o uso de residentes de filoplano com potencial indutor de resistência pode restringir o crescimento de patógenos no interior do tecido do hospedeiro, mesmo que o indutor biótico seja aplicado externamente. Foi o que demonstraram Romeiro et al. (2005) e Vieira Júnior (2005) pela aplicação de *B. cereus* na superfície das folhas de feijoeiro, tendo *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sido inoculada via injeção dentro dos tecidos de feijoeiro comum.

Fatores físicos e biológicos que governam a dinâmica das populações de microrganismos no filoplano

Um dos pioneiros no estudo de ecologia de bactérias do filoplano, foi o Dr. Curt Leben (ANDREWS; HIRANO, 1991), da Ohio State University nos E.U.A. e suas pesquisas representam o desafio na obtenção de agentes de biocontrole eficazes. Seus relatos proferidos no simpósio "Biological Control Strategies in the Phylloplane" ilustram sua frustração ao constatar que, durante o andamento de suas pesquisas, ótimos agentes de biocontrole selecionados *in vitro* e em casa de vegetação, eram ineficientes, por serem incapazes de sobreviverem ou manterem suas populações em alta densidade no filoplano e consequentemente exercerem suas funções no controle de doenças (WINDELS; LINDOW, 1985).

O principal fator que compromete essa capacidade de sobrevivência é a instabilidade ambiental do filoplano (ANDREWS; HIRANO, 1991), que ocasiona uma grande dificuldade no estabelecimento e manutenção de populações de antagonistas potencialmente promissoras, em condições de campo. Para mostrar como esse sistema é complexo, podemos citar alguns exemplos de como a flutuação populacional de bactérias epífitas é afetada pelas mais diversas condições ambientais.

Quanto à influência destes fatores na dispersão de bactérias, Butterworth e McCartney (1991), demonstraram que, geralmente, respingos d'água na folha reduzem a população bacteriana no filoplano, e que grande parte da população desalojada vai para o solo. Entretanto, uma pequena proporção consegue ser dispersa a uma distância relativamente pequena da origem, o que ajuda na sua redistribuição (FITT et al., 1989)

A capacidade de migração de populações também foi investigada por (LINDEMANN; UPPER, 1985) que mostraram que a redistribuição ascendente de populações bacterianas, em ambientes com baixa umidade relativa, tem maior eficiência nos horários onde a temperatura é mais alta, o que pode ser atribuído à maior turbulência do ar nessa situação (ANDREWS;

HIRANO, 1991). Na presença de folhas molhadas por orvalho, com presença de vento; durante chuviscos brandos ou neblina, não houve redistribuição ascendente da população. Portanto, as condições que mais contribuem para dispersão de células bacterianas são baixa umidade relativa com temperaturas elevadas, ou chuvas capazes de promover fortes impactos das gotas no filoplano.

Já para as condições impostas pelo hospedeiro e a época do ano, Périssol et al. (1993), estudando a sucessão de bactérias no filoplano de plantas de carvalho, verificaram que poucos gêneros de bactérias eram capazes de colonizar esse habitat, em virtude da grande seletividade que este ambiente exerce sobre a comunidade microbiana. O gênero *Bacillus* foi predominante em diferentes estações do ano, o que pode estar relacionado a sua habilidade em tolerar mudanças bruscas de temperatura e por sua capacidade em formar estrutura de resistência. A flutuação populacional dos diferentes gêneros também variou de acordo com a estação do ano e a idade das folhas que também teve sua influência. Esse fato também foi constatado por Jacques et al. (1995), em plantas de *Cichorium endivia* var. *latifolia*, a partir da observação de que folhas mais desenvolvidas eram colonizadas por um número maior de células.

Morris (1982), correlacionou a diversidade de bactérias epífitas de feijoeiro com a idade das folhas e verificou que em folhas mais jovens, a maioria dos isolados obtidos utilizavam somente poucas fontes de carbono e nitrogênio, da qual a grande parte era formada por aminoácidos, enquanto para isolados provenientes de folhas mais antigas, uma ampla gama de nutrientes foi utilizada. No caso de *Alternaria* spp., seu desenvolvimento se dá tipicamente em folhas senescentes, estimulado principalmente por açúcares simples exsudados pela folha, o que indica que a diversidade de nutrientes aumenta a medida que as folhas se desenvolvem, influenciando diretamente a composição das populações dos organismos que habitam estes locais (WINDELS; LINDOW, 1985; DEACON, 1997).

Em se tratando da umidade relativa do ar, a medida que esta reduz, ocorre a redução da sobrevivência dos agentes de biocontrole, bem como, o efeito destes no controle de doenças. Saleesman e Leben (1976), verificaram que, em testes com milho, até 99% das células bacterianas que eram capazes de controlar lesões foliares causadas por *Bipolaris maydis* em condições ideais de ambiente perdiam esta capacidade após 1 h em condições de baixa umidade.

A partir desta observação, podemos inferir que métodos de seleção que visem isolados capazes de se estabelecerem e manterem suas populações em situações desfavoráveis aumentam as chances de se encontrar um antagonista com características importantes para o seu estabelecimento no campo (WINDELS; LINDOW, 1985).

Métodos de obtenção de bactérias residentes de filoplano

Método de “imprinting” de folhas

Este método visa a retirada de bactérias que se encontram em nichos mais superficiais das folhas, não atingindo muitas vezes as dobras de nervuras ou interior de estômatos. Mas é um método bastante eficiente e que gera uma grande diversidade de organismos. O isolamento via “imprinting” pode ser feito da seguinte forma:

- Preferencialmente, devem-se coletar folhas em áreas onde ocorram doenças, a fim de se ter maior probabilidade de encontrar um agente de biocontrole eficiente. Vasculhar dentro da área de plantio, plantas saudáveis em meio a plantas doentes pode ser uma estratégia interessante.

- Coletar folhas em plantas com diferentes estádios de crescimento e em diferentes posições na planta (terço inferior, médio e superior). Classifique estas folhas coletadas, a fim de separar estas regiões coletadas.
- Preparar placas contendo meio de isolamento padrão (Kado e Heskett, King B, etc) e se possível, utilizar um meio de decoto de folhas de feijão (250 g de folhas picadas cozidas por 1h + 10g de sacarose + 18g Agar).
- Dividir cada amostra coletada em três grupos, sendo classificados segundo o tratamento dado às folhas: NT (não tratado); DT (lavagem com sabão ou detergente) e HT (imersão de folhas em solução de hipoclorito 0,5 %, por 5 min). Lavar as folhas em água corrente ou como descrito no tratamento. Secar ao ar por alguns minutos.
- Separar 8-10 placas de meio para cada tratamento.
- De cada tratamento, retirar de nove a 12 folhas.
- Pressionar levemente a superfície adaxial da folha (superior) sobre a superfície do meio. Fazer isso em três ou quatro placas, cada uma com uma folha diferente. Repetir o procedimento usando outras folhas, mas agora pressionando a parte inferior da folha sobre o meio.
- Levar as placas para incubadora por 24h e em seguida repicar colônias individualizadas para tubos contendo meio de cultura padrão.

Ultrassom

Neste procedimento, procura-se isolar bactérias que se encontram em regiões mais protegidas na folha.

- Fazer a coleta da mesma maneira descrita anteriormente. Separar as folhas de acordo com a posição que foram coletadas nas plantas (terço inferior, médio, superior).
- Fazer as lavagens descritas acima.
- Em um Erlenmeyer contendo 200 mL de solução salina 0,85 % estéril (0,85 g/100 mL de água destilada estéril), colocar duas a três folhas de feijão dentro do Erlenmeyer. Procurar não ferir as folhas na introdução no frasco.
- Colocar o Erlenmeyer dentro do ultrassom. Encher a cuba do ultrassom com água até 2/3 da capacidade.
- Ligar o aparelho e manter o frasco na cuba por aproximadamente 20 min.
- Retirar o frasco. Desligar o ultrassom.
- Dentro da câmara, retirar as folhas cuidadosamente.
- Proceder a diluição seriada de uma alíquota de 1000 µL da amostra.
- Transferir uma alíquota de 100 µL, para placas de Petri contendo meio de Kado e Heskett. Levar à incubadora por 24h/27 °C.
- Repicar para tubos contendo o meio de Kado e Heskett as colônias individualizadas. Escolher colônias aleatórias. Dar preferência a colônias com cores, tamanhos e formas diferentes.

Agitação em solução salina e diluição seriada

- Em 100 mL de solução salina (0,85 % NaCl) ressuspender 10 g de folha, procedendo-se à extração sob contínua agitação, em um agitador rotatório de plataforma, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, fazer uma diluição em série dos extratos (fator 10) e, de cada diluição, retirar uma alíquota de 50 μ L, e semear em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), com o auxílio da alça de Drigalsky, e incubar a 28 °C.
- As colônias crescidas, fenotipicamente diferentes, devem ser repicadas para tubos contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970).

Considerações finais

As ideias aqui apresentadas demonstram a potencialidade do uso de procariotas residentes de filoplano para o controle de doenças de plantas.

Atualmente, entretanto, poucos são os pesquisadores e instituições que buscam microrganismos com potencialidade de serem usados no futuro como agentes de biocontrole. Isso se deve principalmente às questões legais (comitês de propriedade intelectual, de proteção da biodiversidade natural, etc), bem como à natureza árdua e, muitas vezes, frustrante do trabalho de seleção massal. Essa escassez de “massa crítica” de pesquisa reflete-se no pequeno número de trabalhos publicados sobre o assunto.

Porém, antes de produzir comercialmente um fungicida biológico, muitos testes são necessários.

Sabe-se que a metodologia atual de dispensa de microrganismos em folhas via água é a menos adequada, haja vista que as bactérias são organismos extremamente frágeis e que variações bruscas de temperatura, umidade, incidência de radiações UV, entre outros fatores, que levam a mortalidade de muitas células. Assim torna-se necessário desenvolver métodos adequados de dispensa do agente de biocontrole.

Quanto à seleção em si, o ideal é trabalhar a seleção *in vitro* e *in vivo* em paralelo, pois a não utilização de um dos métodos pode excluir algum microrganismo com potencial de controle. Ademais, na seleção massal *in vivo*, embora prime-se pela qualidade do que é selecionado, não se consegue entender os mecanismos que estão envolvidos no controle, nem mesmo entender como se pode potencializar esses efeitos. Por outro lado, na seleção *in vitro* corre-se o risco de selecionar um microrganismo que apresente elevado nível de inibição dos patógenos, porém, com baixa capacidade de sobrevivência na superfície do hospedeiro.

No que diz respeito ao agente do biocontrole, deve-se dar preferência àqueles que apresentem capacidade de sobrevivência nas diferentes fases da vida do hospedeiro, que tenham facilidade na multiplicação, dispensa e armazenamento e que tenham elevada amplitude de controle de patógenos, nos diferentes grupos (fúngicos, bacterinos, nemátodos, etc.)

Por fim, não se deve esperar que um agente de biocontrole tenha desempenho igual ou superior a um fungicida comercial. É importante pensar no seu uso num sistema de manejo integrado, associado à métodos culturais, físicos e genéticos de resistência e em conjunto com agroquímicos.

Referências

- ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. 156p.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.145-172, 1995.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, St Paul, v.89, n.5, p.353-359, 1999.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. p1-5.
- BORA, L. C.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. N. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, Udaipur, v.23, p.162-168, 1993.
- BUTTERWORTH, J.; MCCARTNEY, H. A. The dispersal of bacteria from leaf surfaces by water splash. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, p.484-496, 1991.
- CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; ARAUJO, J. C. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Residentes de filoplano e sua potencialidade no biocontrole de enfermidades da parte aérea do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.24, p.247, ago. 1999. Suplemento. Resumo.
- COOKSEY, D. A. Reduction of infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using a nonpathogenic, cooper-resistant strain combined with a cooper bactericide. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.5, p.601-603, 1988.
- DEACON, J. W. **Modern Mycology**. 3. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1997. 303p.
- DEHNE, H. W.; STENZEL, K.; SCHÖNBECK, F. Zur wirksamkeit induzierter resistenz unter praktischen anbaubedingungen. III. Reduktion echter mehлтаupilze auf induziert resistente pflanzen. **Z. PflKrank. PflSchutz**, v.91, p258, 1984.
- ELAD, Y.; KÖHL, J.; FOKKEMA, N. J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.100, p.315, 1994.
- FITT, B. D. L.; MCCARTNEY, H. A.; WALKLATE, P. J. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.241-270, 1989.
- HALFELD-VIEIRA, B. de A.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O.; MIZUBUTI, E. S. G. Seleção de bactérias de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole pata três patógenos foliares. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.26, p.488, 2001.
- HALFELD-VIEIRA, B. de A.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. da S.; SILVA, H. S. A.; BARACT-PEREIRA, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 8, p.1247-1252, ago. 2006.
- ISHMARU, C. A.; KLOS, E. J.; BRUBAKER, R. R. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. **Phytopathology**, v.78, p.746-750, 1988.
- JACOB, C. Epiphytic bacteria in relation to pesticides applied on tomato plants. International Congress on plastics in Agriculture, 14, p. 155-157, 1997.
- JACQUES, M. A.; KINKEL, L. L.; MORRIS, C. E. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.899-906, 1995.
- KINKEL, L. L.; WILSON, M.; LINDOW, S. E. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.9, p.3413-3423, 1996.
- KINKEL, L. L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v.35, p.327-347, 1997.

- KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: Evaluation of a marker gene and formulations. **Biological Control**, San Diego, v.13, p.158-165, 1998.
- LAINÉ, M. H.; KARWOSKI, M. T.; RAASKA, L. B. MATTILA-SANDHOLM, T.-M. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* spp. against food poisoning bacteria and moulds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, p.214-21, 1996.
- LAST, F. T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.38, p.221-239, 1955.
- LEITE, R. S. V.; ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; KARASAWA, M.; MAFFIA, L. A.; ARAUJO, J. C. A. Controle biológico de enfermidades da parte aérea de tomateiro pelo uso de residentes de filoplano pré-selecionados como antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.23, p.210, 1998.
- LINDEMANN, J.; UPPER, C. D. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.1229-1232, 1985.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; POMELLA, A. W. V.; SILVA, G. B. S.; DEUNER, C. C. Detecção de compostos antifúngicos produzidos por bactérias residentes de filoplano de cacauero contra *Crinipellis pernicioso*, em condições de laboratório. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.26, p.386, 2001.
- MEYER, J. M.; STINTZI, A.; COULANGES, V.; SHIVAJI, S.; VOSS, J. A.; TARAZ, K.; BUDZIKIEWICZ, H. Siderotyping of fluorescent pseudomonads: characterization of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains from Antarctica. **Microbiology**, Great Britain, v.144, p.3119-3126, 1998.
- MICHEREF, S. J.; SILVEIRA, N. S. S.; REIS, A.; MARIANO, R. L. R. Epiphytic Bacteria Antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam. **Microbial ecology**, New York, v.28, p.101-110, 1994.
- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y.; BEER, S. V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicatorium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.856-863, 1996.
- MORRIS, C. E. Diversity of epiphytic bacterial communities on bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves and pods based on nutrient utilization. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, p.936, 1982.
- PABITRA, K.; BORA, L. C.; BHAGABATI, K. N.; KALITA, P. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.49, p.234-237, 1996.
- PÉRISSOL, C.; ROUX, M.; LE PETIT, J. Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces. **European Journal of Soil Biology**, New Jersey, v.29: p.167-176, 1993.
- ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G.; CARRER FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26: 220-224, 2000.
- ROMEIRO, R. da S.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. ; FERRAZ, H. G. M.; BARRA, V. R. T . A biocontrol agent for bacterial blight that induces systemic resistance as it restrains pathogen multiplication in bean leaf tissue.. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL PLANT DISEASES, 1., 2005, Darmstadt. **Proceedings...** [s.l.? s.n.], 2005. v.1., p.1-6.
- RUINEN, J. Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere. **Nature**, London, v.177, n.4501, p.220-221, 1956.
- SALEESMAN, J. P.; LEBEN, C. Microbial antagonists of *Bipolaris maydis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.1214-1218, 1976.
- SCHÖNBECK, F.; DEHNE, H. W. Use of microbial metabolites inducing resistance against plant pathogens. In: FOKKEMA, N. J.; VAN DEN HEUVEL, J. (Ed.). **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 363p.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S.; LANNA FILHO, R.; MENDONÇA, H. L. Residentes de filoplano bacterianos como agentes de biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.1, p.76, 2004a. Resumo.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S.; LANNA FILHO. Procariotas residentes de filoplano como agentes de biocontrole da mancha angular do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.1, p. 76, 2004b. Resumo.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. 146f. 2005. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. da S. Resistência sistêmica induzida em feijoeiro comum mediada por *Bacillus cereus*, uma bactéria residente de filoplano da cultura. In: REUNIÃO SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS, 3., 2007, Viçosa, MG. **Indução de resistência em plantas a patógenos**: Viçosa, MG: UFV, 2007a. p. 91-107.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; CÔRTEZ, R. A.; SILVEIRA, S. F. da; FERNANDES, C. de F.; SANTOS, M. R. A. dos. Detecção de inibidores da germinação, sideróforos e compostos voláteis produzidos por rizobactérias de maracujazeiro amarelo. In: REUNIÃO AMAZÔNICA DE AGROECOLOGIA, 1., 2007, Manaus, AM. **A agroecologia no contexto amazônico: relatos de experiência**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007b. p. 382-384. 1 CD-ROM.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; CÔRTEZ, R. A.; SILVEIRA, S. F. da; FERNANDES, C. de F.; SANTOS, M. R. A. dos. Antibiose direta de rizobactérias de maracujazeiro amarelo contra fitopatógenos da cultura. In: REUNIÃO AMAZÔNICA DE AGROECOLOGIA, 1., 2007, Manaus, AM. **A agroecologia no contexto amazônico: relatos de experiência**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007c. p.378-381. 1 CD-ROM. il.color.
- WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.379-407, 1988.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (ICE+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (ICE-) biological control agents. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.3128-3137, 1994a.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. The significance of the ecological niche concept in biological control of epiphytic bacterial pests and pathogens. In: FALLEN LEAF LAKE CONFERENCE ON MICROBIAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL CONTROL, 1994, South Lake Tahoe. **Proceedings...** South Lake Tahoe: [s. n.], 1994b. p.15-18.
- WINDELS, C. E.; LINDOW, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS, 1985. 169p.
- ZHANG, Z.; YUEN, G. Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, St. Paul, v.90, p.384-389, 2000.

Embrapa

Rondônia

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

