OLIVEIRA A; SANTOS MHM; SILVEIRA EB; GOMES AMA; MARIANO RLR. 2006. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. *Horticultura Brasileira* 24: 373-377.

Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas

Aldenir de Oliveira^{1*}; Marcos H M dos Santos¹; Elineide B da Silveira²; Andréa M A Gomes²; Rosa de LR Mariano^{3**}

UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, 52171-030 Recife-PE; ¹Estudante de Agronomia; ²Deptº. Biologia/Microbiologia; ³Depº. Agronomia/Fitossanidade; *Bolsista PIBIC/CNPq; **Bolsista Produtividade CNPq; E-mail: elineidebs@yahoo.com.br

RESUMO

Bactérias epifíticas e endofíticas (96 isolados) e fungos endofíticos (69 isolados) foram obtidos de plantas de melão sadias e testados no controle da mancha-aquosa, em condições de casa de vegetação, pelo tratamento de sementes pré-inoculadas com *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ou pelo tratamento de sementes sadias visando a proteção da planta a posterior inoculação com o patógeno. As sementes de melão foram microbiolizadas por imersão nas suspensões ($A_{570} = 0,7$), semeadas e avaliadas quanto ao período de incubação (PI), incidência (INC), severidade da doença (SEV) e redução da severidade da doença (RSD). Apenas a microbiolização de sementes artificialmente infectadas, utilizando os endofíticos ENM5 (não identificado), ENM9 (*Bacillus cereus*), ENM13 (*Bacillus* sp.), ENM16 (*Bacillus cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis*) e ENM43 (*Bacillus* sp.), revelou potencial para o controle da mancha-aquosa. Esses isolados, após o teste de compatibilidade *in vitro*, foram reavaliados isoladamente e em misturas dois a dois quanto ao PI, INC, SEV e RSD, além do índice de doença (IDO) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Todos os tratamentos diferiram significativamente ($P = 0,05$) da testemunha, com RSD de até 93,6%, destacando-se os isolados ENM13 e ENM9 com PI de 7,5 e 7,25 dias, SEV de 0,22 e 0,22, IDO de 2,59 e 2,59, e AACPD de 0,22 e 0,39, respectivamente. Ensaios foram realizados *in vitro* para a determinação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no controle biológico. Os isolados ENM13 e ENM9 solubilizaram fosfato, ENM5 apresentou antibiose contra *A. avenae* subsp. *citrulli*, ENM43 produziu HCN enquanto ENM16 e ENM32 não apresentaram nenhum dos mecanismos testados.

Palavras-chave: *Cucumis melo*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, semente, *Bacillus* spp., controle.

ABSTRACT

Biocontrol of bacterial blotch of melon by seed treatment with epiphytic and endophytic bacteria

Epiphytic and endophytic bacteria (96 strains) and endophytic fungi (69 strains) were isolated from symptomless melon plants and tested for control of fruit blotch under greenhouse conditions, by treating seeds previously inoculated with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* or treating healthy seeds in order to protect the plant challenged later with the pathogen. Melon seeds were microbiolized by immersion in suspensions ($A_{570} = 0,7$), sown and evaluated for incubation period (PI), incidence (INC), disease severity (SEV) and disease severity reduction (RSD). Only microbiolization of artificially infected seed using the endophytic ENM5 (not identified), ENM9 (*Bacillus cereus*), ENM13 (*Bacillus* sp.), ENM16 (*Bacillus cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis*) and ENM43 (*Bacillus* sp.), showed potential for disease control. After *in vitro* compatibility tests, these strains were reevaluated separately and in pairs, in relation to PI, INC, SEV, RSD, disease index (IDO) and area under disease progress curve (AACPD). All treatments differed significantly ($P = 0.05$) from the control reaching 93.6% of RSD, with emphasis for ENM13 and ENM9 with 7.5 and 7.25 days of PI, 0.22 and 0.22 of SEV, 2.59 and 2.59 of IDO, and 0.22 and 0.39 of AACPD, respectively. *In vitro* tests to determine the putative mechanisms of action involved in biocontrol were performed. ENM13 and ENM9 solubilized phosphate, ENM5 presented antibiosis against *A. avenae* subsp. *citrulli*, and ENM43 produced HCN while ENM16 and ENM32 did not show any of the tested mechanisms.

Keywords: *Cucumis melo*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, seed, *Bacillus* spp., control

(Recebido para publicação em 27 de julho de 2005; aceito em 11 de agosto de 2006)

A mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* é a principal doença bacteriana que ocorre nos campos de melão do Nordeste, e responsável por grandes perdas de produção e depreciação dos frutos, principalmente no Rio Grande do Norte e Ceará (Sales Júnior & Menezes, 2001). Desde que Assis *et al.* (1999) relataram a ocorrência dessa doença no Rio Grande do Norte em 1997, têm sido assina-

ladas perdas entre 40 a 50%, atingindo até 100% em períodos chuvosos (Sales Júnior & Menezes, 2001). Posteriormente, essa doença também foi relatada no Ceará (Santos & Viana, 2000), Pernambuco (Mariano & Silveira, 2004) e Bahia (Mariano *et al.*, 2004a).

Os sintomas da mancha-aquosa podem se manifestar em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Nas folhas cotiledonares e verdadeiras as lesões são

inicialmente aquosas e em seguida passam a necróticas. Nos frutos as lesões permanecem aquosas por longo período e correspondem internamente a uma lesão de cor marrom claro a marrom escuro na polpa, chegando até as sementes.

As medidas eficientes para controle da doença são escassas, e após introduzida em uma área é de difícil erradicação (Sales Júnior & Menezes, 2001). Assim, alternativas para o seu

controle devem ser avaliadas e, dentre elas, cita-se o controle biológico através de bactérias biocontroladoras (Medeiros *et al.*, 2002, 2003; Santos, 2004; Fessehaie & Walcott, 2005).

Como a bactéria causadora da mancha-aquosa do melão é disseminada por meio de sementes infectadas (O'Brien & Martin, 1999), o tratamento das sementes com microrganismos promotores do crescimento de plantas que seja eficiente para inibir o patógeno ou proteger a plântula emergente constitui em alternativa de controle economicamente desejável para o manejo da doença, podendo ser integrado com outras técnicas para melhorar a eficiência. Os microrganismos agentes de biocontrole de doenças de plantas podem atuar através de diferentes mecanismos, como produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe^{+3} e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (Mariano *et al.*, 2004b).

O presente trabalho teve como objetivos isolar e selecionar microrganismos para o controle biológico da mancha-aquosa do melão em condições de casa de vegetação, e determinar possíveis mecanismos relacionados ao antagonismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de microrganismos

Para o isolamento de microrganismos epifíticos e endofíticos foram utilizados raízes, caules, folhas, flores, frutos e/ou sementes de plantas de melão sadias, oriundas de cultivos comerciais em Mossoró (RN), Juazeiro (BA) e Petrolina (PE) e área experimental em Recife (PE). Para isolamento de bactérias epifíticas e endofíticas foram utilizados métodos descritos por Gomes *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2004). Nos dois métodos, as placas foram mantidas por 48 horas à temperatura ambiente de $27\pm 2^\circ C$. Foram selecionadas colônias com características distintas umas das outras, com base nas observações macroscópicas, como coloração e características de crescimento em meio de cultura Tryptic Soy Agar – TSA (40 g de TSA; 10 g ágar; 1000 mL de água destilada). Estas colônias foram purificadas e preservadas em meio ágar nutritivo (3,0 g de extrato de carne; 5,0

g de peptona; 18 g de ágar; 1000 mL de água destilada).

No isolamento dos fungos endofíticos, empregou-se o método descrito por Oliveira *et al.* (2004), sendo as placas incubadas à temperatura ambiente ($27\pm 2^\circ C$) por sete dias. Após esse período, as colônias fúngicas desenvolvidas em torno dos fragmentos foram separadas de acordo com as características das culturas em meio batata-dextrose-ágar (20 g de dextrose; 20 g de ágar; caldo de 200 g de batata cozida em água, e 1000 mL de água destilada). As colônias foram purificadas e preservadas no mesmo meio de cultura.

Seleção de microrganismos para sementes pré-inoculadas

Sementes comerciais de melão híbrido AF682 foram lavadas em água corrente por 10 minutos, submetidas a secagem por 48 h, inoculadas por infiltração a vácuo com o inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac1*) na concentração de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL e armazenadas em sacos de papel após secas. Após sete dias, foram imersas em suspensões ($A_{570} = 0,7$) de bactérias epifíticas (34 isolados) e endofíticas (62 isolados) ou fungos endofíticos (59 isolados), por 10 minutos. As testemunhas relativas e absolutas foram inoculadas com o patógeno e com água destilada esterilizada (ADE), respectivamente. Decorridas 16 h procedeu-se a semeadura em bandejas de poliestireno com 120 células contendo substrato comercial Plantmax®. Após a emergência, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 48 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 98 tratamentos (34 isolados de bactérias epifíticas, 62 isolados de bactérias endofíticas, uma testemunha absoluta e uma testemunha relativa) ou 61 tratamentos (59 isolados de fungos endofíticos, uma testemunha absoluta e uma testemunha relativa), respectivamente para os experimentos com as bactérias e fungos, e oito repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma plântula. As plântulas foram avaliadas diariamente, até o quinto dia da retirada da câmara úmida, determinando-se os seguintes componentes da doença: a) período de incubação (PI), calculado pelo número de dias entre a emergência das plântulas e o surgimento dos sintomas da doença. Plântulas sem sintomas da doença tiveram o PI ajustado para 8 dias, correspondendo ao período de avaliação total acrescido de um dia, conforme proposto por Iamsupisit *et al.* (1993); b)

incidência (INC), calculada pela porcentagem de plântulas com sintomas da doença em relação ao total de plântulas avaliadas; c) severidade da doença (SEV) aos sete dias após germinação das sementes, estimada com o auxílio de escala descritiva, com notas variando de 0 a 5 (Silveira *et al.*, 2003); e d) redução da severidade da doença (RSD), calculada através da fórmula $RSD = (SEV_{\text{Testemunha}} - SEV_{\text{Tratamento}}) \times 100 / SEV_{\text{Testemunha}}$.

Seleção de microrganismos para plantas pós-inoculadas

Sementes comerciais de melão (híbrido AF682) foram imersas nas suspensões dos isolados de bactérias epifíticas e endofíticas ou de fungos endofíticos ($A_{570} = 0,7$) durante 10 minutos, sendo postas para secar em papel de filtro por 16 horas. As sementes da testemunha foram tratadas com ADE. Em seguida, efetuou-se o plantio em copos de 500 mL contendo a mistura solo esterilizado/substrato Plantmax® (1:1 v/v). Após 20 dias as plantas foram submetidas à câmara úmida por 24 horas e então pulverizadas com uma suspensão de *Aac1* com concentração de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL, sendo novamente mantidas em câmara úmida por 24 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 97 tratamentos (34 isolados de bactérias epifíticas, 62 isolados de bactérias endofíticas e uma testemunha relativa) ou 60 tratamentos (59 isolados de fungos endofíticos e uma testemunha relativa), respectivamente para os experimentos utilizando bactérias e fungos, e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por duas folhas de uma planta. As plantas foram avaliadas diariamente, até cinco dias após a retirada da câmara úmida, determinando-se os componentes da doença PI, INC, SEV e RSD. Para a determinação da SEV em plantas, foi utilizada a escala descritiva de notas adaptada por Silveira *et al.* (2003).

Efeito de misturas de isolados bacterianos pelo tratamento de sementes infectadas

Na avaliação da compatibilidade entre os isolados bacterianos selecionados foi empregado o método de antibiose bactéria x bactéria (Mariano *et al.*, 2005), com as suspensões bacterianas ajustadas para concentração $A_{570} = 0,7$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 30 tratamentos (seis isolados testados entre si) e quatro repetições, sendo cada

repetição constituída por duas placas de Petri contendo quatro discos cada.

As suspensões dos isolados bacterianos foram preparadas separadamente e em misturas dois a dois, em volumes iguais, e foram aplicadas às sementes conforme método descrito anteriormente para o tratamento de sementes pré-inoculadas com *A. avenae* subsp. *citrulli*. Além do PI, INC, SEV e RSD, foi determinado o índice de doença (IDO) no sétimo dia após a emergência das plântulas, calculado de acordo com McKinney (1923) pela fórmula $IDO = \frac{\text{Ó (grau de escala} \times \text{frequência)}}{\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$, utilizando-se os dados de severidade da doença, e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada pela fórmula $AACPD = \frac{[\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_i]}{n}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de SEV observados em duas avaliações consecutivas e d_i , o intervalo entre duas avaliações (Shaner & Finney, 1977). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 22 tratamentos (seis bactérias endofíticas isoladamente, 15 combinações de isolados bacterianos e uma testemunha relativa) e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por duas plântulas.

Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise de variância e, as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ou Duncan ($P=0,05$).

Determinação do mecanismo de ação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos previamente selecionados como eficientes no controle da mancha-aquosa foram avaliados quanto a antibiose, produção de ácido cianídrico (HCN) e solubilização de fosfato, de acordo com os métodos descritos por Cattelan (1999) e Mariano *et al.* (2005). Como padrões positivos para produção de HCN e solubilização de fosfato foram utilizados respectivamente os isolados de *Burkholderia cepacia* GN1201 e *Pseudomonas chlororaphis* GN1212. O delineamento experimental para cada teste foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos (seis bactérias endofíticas e um padrão positivo) e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De plantas sadias de melão de diversas localidades foram obtidos 37 isolados de bactérias epifíticas (9 de raízes,

10 de caule, 15 de folhas, 1 de flor e 2 de frutos), dos quais três perderam a viabilidade durante o processo de purificação; 62 isolados de bactérias endofíticas (19 de raízes, 22 de caules, 13 de folhas, 5 de flores e 3 de sementes) e 59 isolados de fungos filamentosos endofíticos (19 de raízes, 14 de caules, 17 de folhas, 5 de flores, 2 de frutos e 2 sementes). De acordo com McInroy & Kloepper (1995), isolados bacterianos provenientes da própria comunidade endofítica e epifítica da planta, podem ser potenciais agentes de controle biológico.

Dos 96 isolados bacterianos avaliados para o controle da mancha-aquosa através do tratamento de sementes pré-inoculadas com *A. avenae* subsp. *citrulli* foram selecionados, respectivamente quanto, ao período de incubação, incidência e severidade, os endofíticos ENM5 (4,0; 75,0%; 1,6), ENM9 (4,2; 62,5%; 1,9), ENM13 (7,0; 37,5%; 0,63), ENM16 (4,2; 62,5%; 1,9), ENM32 (4,7; 62,5%; 1,6) e ENM43 (4,25; 62,5%; 1,9), que diferiram significativamente da testemunha relativa (3,0; 87,5%, 2,75) pelo teste de Scott-Knott ($P=0,05$) (dados não exibidos em tabela). Os isolados ENM5, ENM9 e ENM16 foram obtidos de raízes, o isolado ENM32 de fragmentos de caule e o ENM43, de folhas de melão.

Dos isolados avaliados, apenas 5% apresentaram potencial para o controle da mancha-aquosa, sendo todos endofíticos. Esse percentual pode ser considerado elevado, uma vez que na maioria das pesquisas realizadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas menos de 1% dos isolados são eficientes (Chen *et al.*, 1996). Bactérias endofíticas utilizadas no biocontrole de doenças de plantas apresentam como principais vantagens, em relação às epifíticas, possuírem nicho ecológico similar ao do patógeno e serem protegidas das diversas influências abióticas (Halmann *et al.*, 1997).

Os isolados ENM5 (não identificado), ENM9 (*Bacillus cereus*), ENM13 (*Bacillus* sp.), ENM16 (*Bacillus cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis*), e ENM43 (*Bacillus* sp.), apresentaram compatibilidade *in vitro* e, tanto isoladamente quanto em misturas, mostraram-se eficientes no controle da mancha-aquosa do melão, diferindo significativamente ($P=0,05$) da testemunha em relação as variáveis severidade, índice de doença e área abaixo da curva de progresso da

doença (Tabela 1). Esses isolados apresentaram redução da severidade da doença de até 93,6% (Figura 1). Não foi observado efeito aditivo ou sinérgico significativo para as misturas de isolados no controle da mancha-aquosa. Os resultados indicam que a aplicação de apenas um isolado para bacterização de sementes de melão é mais prática e econômica, destacando-se com maiores níveis de controle os isolados ENM13 e ENM9, os quais apresentaram respectivamente, período de incubação de 7,5 e 7,25 dias, severidade de 0,22 e 0,22, índice de doença de 2,59 e 2,59, e área abaixo da curva de progresso da doença de 0,22 e 0,39 (Tabela 1).

Resultados promissores com utilização de *Bacillus* para controle da mancha-aquosa foram relatados recentemente na literatura. Medeiros *et al.* (2002) obtiveram controle eficiente da mancha-aquosa em casa de vegetação com emprego do *Bacillus* sp. RAB9 no tratamento de sementes infectadas. Também Santos (2004) conseguiu o controle através do tratamento de sementes infectadas com líquidos fermentados com ou sem presença das células de *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. pumilis* C116, *Bacillus* sp. MEN2, tendo caracterizado que o mecanismo de ação desses isolados deveu-se a antibiose e à presença de compostos ativos parcialmente caracterizados como lipopeptídeos. Espécies de *Bacillus* têm sido amplamente testadas no controle biológico, uma vez que produzem endósporos, o que facilita a formulação dos produtos para aplicação comercial. Para o controle de diferentes doenças, produtos como Companion, EcoGuard, HiStick N/T, Kodiak, Rhizo-Plus, Serenade, Subtlex e YieldShield, a base de *Bacillus*, são registrados para uso agrícola nos Estados Unidos (Mariano *et al.*, 2004b).

O principal modo de disseminação de *A. avenae* subsp. *citrulli* é através das sementes contaminadas (Hopkins *et al.*, 1996), provável causa da introdução da mancha-aquosa no Rio Grande do Norte (Assis *et al.*, 1999), podendo essa transmissão variar de 10 até 91% (O'Brien & Martin, 1999; Oliveira *et al.*, 2001). Como os isolados endofíticos selecionados no presente trabalho se mostraram eficientes, estes poderão ser indicados para o tratamento de sementes infectadas com *A. avenae* subsp. *citrulli* individualmente ou em combinação com outros métodos de controle.

Tabela 1. Controle da mancha-aquosa do melão com bactérias endofíticas, isoladamente ou em misturas, através do tratamento de sementes pré-inoculadas com *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, em casa de vegetação.

Tratamento	Período de incubação (dias)	Severidade (0-5)	Índice de doença	Área abaixo da curva de progresso da doença
ENM131	7,50a ²	0,22b	2,59c	0,22b
ENM9	7,25ab	0,22b	2,59c	0,39b
ENM9+ ENM13	7,25ab	0,46b	3,66c	0,23b
ENM5+ ENM13	7,25ab	0,22b	2,59c	0,31b
ENM9+ ENM32	7,00ab	0,46b	3,66c	0,33b
ENM5+ ENM43	7,00ab	0,72b	6,49bc	0,30b
ENM16	7,00ab	0,46b	6,79bc	1,01b
ENM43	7,00ab	0,46b	5,13bc	0,38b
ENM13+ ENM16	6,75ab	0,72b	6,49bc	0,42b
ENM5+ ENM16	6,75ab	0,46b	8,23bc	0,70b
ENM5	6,75ab	0,66b	6,40bc	0,51b
ENM9+ ENM43	6,50ab	0,46b	6,40bc	0,79b
ENM16+ ENM32	6,50ab	0,72b	6,49bc	0,52b
ENM32+ ENM43	6,50ab	0,46b	5,12bc	0,60b
ENM13+ ENM43	6,50ab	1,23b	17,26bc	1,35b
ENM5+ ENM32	6,50ab	0,46b	6,40bc	0,77b
ENM32	6,00ab	0,72b	9,89bc	0,93b
ENM9+ ENM16	5,73ab	0,93b	13,64bc	1,24b
ENM16+ ENM43	5,25abc	1,00b	12,20bc	1,18b
ENM5+ ENM9	5,25abc	0,72b	12,08bc	1,21b
ENM13+ ENM32	4,50bc	1,23b	26,92b	2,04b
Testemunha	3,00c	3,43a	76,25a	12,40a
C.V. (%)	25,27	17,62	24,92	30,47

¹ENM= isolados de bactérias endofíticas de melão. ENM5 – não identificado; ENM9 – *Bacillus cereus*; ENM13 – *Bacillus* sp.; ENM16 – *B. cereus*; ENM32 – *Bacillus subtilis*. ENM34 – *Bacillus* sp.; ²Médias de 5 repetições, com duas plântulas cada. Médias de severidade, índice de doença e área abaixo da curva de progresso da doença transformadas segundo $\sqrt{(x+1,0)}$. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan (P= 0,05).

Nos ensaios realizados *in vitro* quanto a determinação dos mecanismos de ação envolvidos no biocontrole da mancha-aquosa, verificou-se que os isolados ENM13 e ENM9 solubilizaram fosfato. ENM5 exerceu antibiose contra *A. avenae* subsp. *citrulli* e ENM43 produziu HCN. Nenhum dos mecanismos estudados está relacionado ao controle exercido pelos isolados ENM16 e ENM32. Esses mecanismos de ação já foram relatados anteriormente associados ao controle de doenças por *Bacillus* spp. e outras bactérias. Segundo Melo (1998), o biocontrole exercido por *B. megaterium* var. *phosphaticum* inclui aumento da solubilização de fosfato orgânico via ação da fosfatase ou solubilização de fosfatos inorgânicos com ácidos orgânicos e subsequente incremento na absorção desse elemento pela planta, o que a torna mais

resistente ao patógeno. Isolados de *Bacillus subtilis* (R14), *B. pumilis* (C116), *B. megaterium* pv. *cerealis* (RAB7) e *B. cereus* apresentaram atividade antibiótica *in vitro* a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Luna et al., 2002). Défago et al. (1990) apresentaram evidências de que o HCN é benéfico no controle microbiológico, sendo esse composto relacionado à supressão da podridão preta das raízes do fumo pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Na prática, provavelmente, poucos microrganismos exercem um único mecanismo antagônico, bem como os mecanismos não são mutuamente exclusivos, uma vez que sua importância relativa pode ser variável com as condições ambientais, estágio de desenvolvimento do agente biocontrolador e do fitopatógeno (Andrews, 1992). No presente estudo, apesar da maioria dos iso-

lados testados terem apresentado individualmente mecanismos de ação diferentes, quando avaliados em combinações não se observou efeito aditivo ou sinérgico para o controle da mancha-aquosa (Tabela 1).

Com relação ao controle da mancha-aquosa do melão pela proteção da planta com bactérias epifíticas e endofíticas, dos 96 isolados testados inicialmente foram selecionados por diferirem significativamente (P= 0,05) da testemunha pelo teste de Scott-Knott, respectivamente quanto à incidência e severidade os endofíticos ENM2 (66,7%; 2,0), ENM8 (66,7%; 2,0), ENM24 (66,7%; 1,0) e ENM30 (66,7%; 2,0) (100,0%; 3,0) (dados não exibidos em tabela). Contudo, esses isolados não se mostraram eficientes no controle da mancha-aquosa após o experimento ter sido repetido mais duas vezes. Segundo Fravel (1999), fatores como a falta de repetibilidade de resultados obtidos durante o tempo e condução dos experimentos tem sido um dos maiores obstáculos no controle biológico de doenças de plantas. Weller (1988) cita como fatores responsáveis pelo desempenho inconsistente de um biocontrolador a perda da competitividade ecológica devido à alteração de alguma característica da bactéria, a variação na colonização pelo antagonista, e a interferência de fatores bióticos e abióticos. Em trabalhos realizado por Medeiros et al. (2003), plantas de melão foram protegidas contra *A. avenae* subsp. *citrulli* quando pulverizadas aos sete dias de idade com o isolados de *Bacillus* spp. Fessehaie & Walcott (2005) estudaram a proteção de flores de melancia para evitar-se a infecção das sementes pela bactéria e verificaram uma redução no percentual de sementes infectadas da ordem de 13,8% quando do tratamento prévio com *A. avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) antes da inoculação com *A. avenae* subsp. *citrulli*.

Dos 59 isolados de fungos filamentosos endofíticos avaliados nenhum foi eficiente no controle da mancha-aquosa, quer seja no tratamento de sementes infectadas ou pulverização sobre as plantas (dados não apresentados). Existem diferentes relatos da utilização de espécies de fungos filamentosos, a exemplo dos gêneros *Trichoderma*, *Pythium* e *Fusarium*, porém para o controle de doenças fúngicas, algumas das quais na filosfera de plantas (Mariano et al., 2000).

Os resultados apresentados demonstram que os seis antagonistas selecionados têm potencial como agentes de biocontrole da mancha-aquosa em melão. Também, o tratamento de sementes é de grande potencial por ser método prático e simples no controle dessa doença importante para os produtores devido às perdas que causa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro (Proc. 473024/2003-9) e bolsas de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS JH. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635.
- ASSIS SMP; MARIANO RLR; SILVA-HANLIN DMW; DUARTE V. 1999. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*, no Estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 24: 191.
- CATTELAN AJ. 1999. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja. 36p.
- CHEN Y; MEI R; LIU L; KLOPPER JW. 1996. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE RS; GUPTA VK (Eds). *Management of soil born disease*. Ludhiana: Kalyani Publishers. p. 165-184.
- DÉFAGO G; BERLING IH; BURGER U; HAAS D; KAHR G; KEEL C; VOISARD C; WIRTHNER PH; WUTHRICH B. 1990. Suppression of black root rot of tobacco by *Pseudomonas* strain: potential applications and mechanisms. In: HORNBY D; COOK RJ; HENIS Y (Eds). *Biological control of soil-borne plant pathogen*. Wallingford: CAB International. p. 93-108.
- FESSEHAIE A; WALCOTT RR. 2005. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*. *Phytopathology* 95: 413-419.
- FRAVEL D. 1999. Hurdles and bottlenecks on the road to biocontrol of plant pathogens. *Australasian Plant Pathology* 28: 53-56.
- GOMES AMA; MARIANO RLR; MICHEREFF SJ; SILVEIRA EB; ASSIS SMP. 2005. Isolamento de bactérias para teste de antagonismo. In: MARIANO RLR; SILVEIRA EB (Coords). *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: RLR Mariano. p. 119-125.
- HALMANN J; KLOPPER JW; RODRIGUEZ-KABANA R. 1997. Application of the scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 411-416.
- HOPKINS DL; CUCUZZA JD; WATERWON JC. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Disease* 80: 529-532.
- IAMSUPASIT N; CHACKRABORTY S; CAMERON DF; ADKINS SW. 1993. Components of quantitative resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in tetraploid accessions of the pasture legume *Stylosanthes hamata*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 33: 855-860.
- LUNA CL; MARIANO RLR; SOUTO-MAIOR AM. 2002. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19: 133-142.
- MARIANO RLR; GOMES AMA; ASSIS SMP; SILVEIRA EB. 2005. Mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MARIANO RLR; SILVEIRA EB (Coords). *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: RLR Mariano. p. 143-158.
- MARIANO RLR; SILVA VAV; SILVA AMF; MEDEIROS FHV; VIANA IP. 2004a. Ocorrência da mancha-aquosa do melão na Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 29: 147-148. (Resumo).
- MARIANO RLR; SILVEIRA EB. 2004. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 1: 79-88.
- MARIANO RLR; SILVEIRA EB; ASSIS SMP; GOMES AMA; NASCIMENTO AR; DONATO VMTS. 2004b. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 1: 89-111.
- MARIANO RLR; SILVEIRA EB; GOMES AMA; RODRIGUES VJLB; ASSIS SMP. 2000. Biocontrole de doenças de plantas. In: TORRES JB; MICHEREFF SJ (Eds). *Desafios do manejo integrado de doenças de plantas*. Recife: UFRPE. p. 78-111.
- McKINNEY RH. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26: 195-218.
- MCINROY JA; KLOPPER JW. 1995. A survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 1-6.
- MEDEIROS FHV; MORAES ISF; MARIANO RLR. 2002. Utilização de sementes para o controle da mancha-aquosa do melão. *Fitopatologia Brasileira* 27: 64. (Resumo).
- MEDEIROS FHV; SILVA NETO EB; MARIANO RLR; VIANA IO. 2003. Proteção de plantas de melão contra *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* mediada por *Bacillus* spp. *Fitopatologia Brasileira* 27: 368. (Resumo).
- MELO IS. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO IS; AZEVEDO JL (Eds). *Controle Biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA. p. 17-67.
- O'BRIEN RG; MARTIN AL. 1999. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39: 479-485.
- OLIVEIRA IS; JÚNIOR RS; MARIANO RLR. 2001. *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*: Métodos de isolamento e transmissão por sementes. *Fitopatologia Brasileira* 26: 302. (Resumo).
- OLIVERIA A; SANTOS MHM; SILVEIRA EB. 2004. Isolamento de microrganismos epifíticos e endofíticos de plantas de melão. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 4. *Resumos...* Recife: UFRPE. 2p. CD Rom.
- SALES JÚNIOR R; MENEZES JB. 2001. *Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN*. Mossoró: UFRPE. 25p. (Relatório Técnico).
- SANTOS AA; VIANA FM. 2000. *Mancha-aquosa do melão*. Ceará: EMBRAPA. 2p.
- SANTOS ER. 2004. Controle biológico da mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*. Recife: UFPE. 60p. (Tese mestrado).
- SHANER G; FINNEY RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- SILVEIRA EB; MARIANO RLR; MICHEREFF SJ. 2003. Variabilidade de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* no estado do Rio Grande do Norte. *Summa Phytopathologica* 29: 255-261.
- WELLER DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.

Figura 1. Redução da severidade da mancha-aquosa do melão por isolados de bactérias endofíticas (ENM5 – não identificado; ENM9 – *Bacillus cereus*; ENM13 – *Bacillus* sp.; ENM16 – *B. cereus*; ENM32 – *Bacillus subtilis*; ENM43 – *Bacillus* sp.), através do tratamento de sementes pré-inoculadas com *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli*, em casa de vegetação