



Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias

Dediel Júnior A. Rocha & Andréa B. Moura

Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, 96010-970, Pelotas, RS, Brasil

Autor para correspondência: Andréa B. Moura, e-mail: abmoura@ufpel.edu.br

RESUMO

A busca por alternativas ao uso intensivo de agrotóxicos no controle de doenças tem recebido grande atenção da pesquisa agrícola. Rizobactérias têm reconhecida capacidade de reduzir doenças em diversas culturas e promover de crescimento de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de seis isolados de rizobactérias, pré-selecionadas, no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), em casa-de-vegetação e relacionar este comportamento a produção de compostos "in vitro". Foi avaliada a capacidade de estas rizobactérias produzirem quitinases, amilases, lipases, compostos antibióticos e de solubilizar fosfato. A microbiolização das sementes com a rizobactéria DFs1421 (*Pseudomonas* sp.) reduziu os valores de AACPD de murcha bacteriana em ambos os ensaios (36,6 e 91,7% no primeiro e segundo ensaios respectivamente). Este controle pode ser associado à produção de compostos responsáveis pela antibiose observada "in vitro". Isolados de *Streptomyces* (DFs1296 e DFs1315), bem como de *Bacillus* (DFs1414) e o indutor químico ASM reduziram significativamente a murcha de fusário, variando de 22,5 a 76%. O controle observado por parte das rizobactérias pode ser atribuído à atividade quitinolítica e/ou antibiótica por compostos voláteis.

Palavras-chaves: *Solanum lycopersicum*, biocontrole, murcha bacteriana, murcha de fusário

ABSTRACT

Biological control of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by rhizobacteria

Replacing the intensive use of pesticides for alternative methods in disease control has been an important aim for agricultural research. Rhizobacteria are known to be capable of reducing diseases levels in many crops and also of promoting plant growth. The objective of this work was to evaluate the efficacy of six pre-selected rhizobacteria isolates in controlling *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) under controlled conditions in a greenhouse, and to link such capacity to the "in vitro" production of selected biologically active compounds. The ability of these rhizobacteria isolates to produce chitinases, amylases, lipases, antibiotic compounds was investigated. Additionally, their ability in solubilizing phosphate was also checked. Microbiolization of seeds with one rhizobacterium DFs1421 (*Pseudomonas* sp.) reduced the tomato wilt AUDPC in both assays (36.6 and 91.7% in the first and second assays respectively). Such efficacy in wilt control is likely to be linked with the production of antibiotics as observed "in vitro". *Streptomyces* (DFs1296 and DFs1315) and *Bacillus* (DFs1414), and the chemical inducer (ASM) reduced significantly fusarium wilt ranging 22.5 to 76%. This may be owing to the observed chitinolytic activity and / or antibiosis in the presence of volatile compounds.

Key words: *Solanum lycopersicum*, biocontrol, bacterial wilt, fusarium wilt

INTRODUÇÃO

Diversas doenças afetam a cultura do tomateiro, sendo que as de etiologia bacteriana estão entre as que causam maiores prejuízos. Dentre estas, a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. é responsável por perdas elevadas em culturas instaladas nas diversas regiões brasileiras (Lopes & Ávila, 2005).

Ralstonia solanacearum possui uma ampla gama de hospedeiros, na qual estão centenas de espécies de plantas pertencentes a 44 famílias botânicas. Esta bactéria apresenta grande variabilidade genética e é capaz de sobreviver no solo por vários anos, associada aos restos de cultura e à rizosfera de plantas. Por apresentar uma fase saprofítica em seu ciclo de vida, a bactéria aumenta suas possibilidades de

sobrevivência no solo, mesmo na ausência de hospedeiros (Hayward, 1991).

Outra doença de importância econômica na cultura do tomateiro é a murcha de fusário causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen (FOL) (Kurozawa & Pavan, 2005). Uma vez introduzido em áreas de cultivo, este patógeno pode permanecer viável durante anos devido à sua capacidade de produzir estruturas de resistência (clamidósporos) (Agrios, 2005). FOL é agrupado em três raças fisiológicas, conforme sua habilidade de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras contendo diferentes loci de resistência. No Brasil, as raças 1 e 2 encontram-se amplamente distribuídas, enquanto a raça 3 está restrita a algumas regiões (Reis et al., 2005).

O controle químico não é efetivo e nem economicamente viável para o controle da murcha bacteriana e murcha de fusário do tomateiro (Lopes & Ávila, 2005). Nas áreas onde estes patógenos ainda não ocorrem, o manejo pelo princípio da exclusão, visando o impedimento da entrada do patógeno na área de cultivo, é o mais importante. Em áreas onde FOL já se encontra estabelecido, um dos métodos mais eficazes de redução de perdas é o controle genético, por meio do plantio de cultivares resistentes (Reis et al., 2005). Apesar de existirem cultivares e híbridos comerciais de tomateiro resistentes à murcha de fusário, estes apresentam geralmente resistência às raças fisiológicas 1 e 2 do patógeno. Contudo, cultivares comerciais que demonstram resistência a raça fisiológica 3 ainda não estão disponíveis no Brasil (Reis et al., 2005). A obtenção de variedades resistentes à *R. solanacearum* é bastante difícil, devido à dificuldade de se achar boas fontes de resistência às diferentes variantes da bactéria. Adicionalmente, a resistência do tomateiro à murcha bacteriana é do tipo poligênica e pode sofrer interferência do ambiente ou traz consigo características agrônomicas indesejáveis (Lopes & Ávila, 2005).

O controle biológico com o uso de rizobactérias promotoras do crescimento pode ser uma alternativa para o manejo de patógenos habitantes do solo, considerados de difícil controle (Thanh, et al., 2009). As rizobactérias são conhecidas por promover o crescimento de plantas, bem como a diminuição da quantidade de doenças em diversas culturas (Van Loon et al., 1998; Whipps, 2001). O controle de doenças pela colonização das raízes das plantas por rizobactérias pode ocorrer diretamente, por meio de competição por espaço, nutrientes e nicho ecológico ou pela produção de substâncias antimicrobianas ou ainda indiretamente, por meio da indução de resistência sistêmica (ISR) (Haas & Défago, 2005). Rizobactérias têm se mostrado promissoras como ferramenta para o manejo da murcha de fusário em tomateiro, tanto em casa-de-vegetação, como em condições de campo (Son et al., 2009; Shanmugam & Kanoujia, 2011). Trabalhos também têm sido conduzidos na tentativa de se obter o controle da murcha bacteriana pela aplicação de rizobactérias antagonistas (Moura et al., 1998; Anith & Momol, 2004; Lemessa & Zeller, 2007; Vanitha et al., 2009).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da microbiolização de sementes de tomateiro com seis isolados de rizobactérias, selecionados anteriormente para uso no controle da mancha bacteriana e oídio, no controle de *R. solanacearum* e FOL em casa-de-vegetação. Além disso, buscaram-se evidências de conexão entre a capacidade de produção de compostos bioativos “in vitro” por estes isolados e seu efeito como biocontroladores de *R. solanacearum* e FOL.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos utilizados

Os isolados de rizobactérias utilizados foram: *Streptomyces* spp - DFs1296 e DFs1315; *Bacillus* spp

- DFs1414, DFS1420 e DFs1423; e *Pseudomonas* sp. - DFs1421. Estes foram obtidos por isolamento de solo sob cultivo de gramíneas e laranja (*Streptomyces* spp.) e de rizosfera de tomateiro (demais rizobactérias) e identificadas ao nível de gênero por sequenciamento do gene rDNA 16S. Estes isolados haviam sido selecionados em trabalhos anteriores como antagonistas à *R. solanacearum* (Moura et al., 1998), *Xanthomonas gardneri* (ex Sutip) Jones et. al. e oídio, *Oidium* sp. (Naue, 2009) e como promotores de crescimento (Deuner, 2004) em condições de casa-de-vegetação. Estas bactérias fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas.

Utilizaram-se nos experimentos um isolado de *R. solanacearum* (DFs-RS01), obtido de tomateiro com sintomas severos de murcha, proveniente do município Pelotas-RS e um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (UFV-FOL01) cedido pelo Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da Universidade Federal de Viçosa, obtido de plantas de tomate com sintomas de murcha. A patogenicidade de ambos os patógenos foi confirmada previamente à realização dos experimentos pela inoculação de plantas de tomateiro em casa-de-vegetação e reisolamento dos mesmos.

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

Foi avaliada a capacidade das rizobactérias em solubilizar fosfato, produzir amilases, lipases e quitinases. A solubilização de fosfato de cálcio foi avaliada em meio TSA acrescido de solução de fosfato de cálcio (CaH_2PO_4), após 7 dias de incubação a 28 °C pela observação de formação ou não de halo transparente (Romeiro, 2007). A produção de quitinases foi verificada em meio cuja única fonte de carbono foi quitina coloidal, observando-se a ocorrência ou não de halo claro de degradação (Romeiro, 2007). A presença de amilases foi determinada pela degradação de amido no meio, revelada pela coloração com iodo (Mariano & Silveira, 2005). A produção de lipases foi detectada utilizando-se meio de Tween 80 e verificando-se a formação ou não de precipitado leitoso ao redor das colônias (Mariano & Silveira, 2005).

Foi avaliada a capacidade de antibiose “in vitro” em meio 523 (Kado & Heskett, 1970). Antibiose contra *R. solanacearum* foi avaliada pelo método de sobrecamada de meio semissólido acrescido de crescimento bacteriano com 24 horas de incubação (1%) (Romeiro, 2007). A antibiose foi determinada pela observação da formação (positivo) ou não (negativo) de halo de inibição do crescimento bacteriano após 24 horas de incubação a 28 °C. A antibiose contra FOL foi determinada pela produção de compostos não voláteis utilizando o pareamento de culturas e, por compostos voláteis utilizando placas sobrepostas (Romeiro, 2007) após incubação por 7 dias a 24 °C. Foi avaliada a redução do crescimento do micélio do patógeno, quando

comparado com uma testemunha não tratada (na ausência de crescimento de rizobactérias). Cada tratamento constituiu-se de três repetições em um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada placa considerada uma unidade experimental.

Ensaio em casa-de-vegetação

Microbiolização das sementes

Sementes de tomateiro, cv. Super Marmande, foram imersas em suspensão de cada rizobactéria, preparada com solução salina (0,85% NaCl) e crescimento bacteriano de 24 h a 28 °C. Erlenmeyers de 50 mL contendo sementes e suspensão de cada rizobactéria foram mantidos a temperatura de 4 °C durante 4 h sob agitação em agitador orbital com 100 OPM. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para $A_{540} = 0,5$, correspondente à aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL⁻¹). Sementes imersas somente em solução salina serviram como testemunha, bem como foram utilizadas para a produção de mudas para o tratamento com pulverizações semanais.

Foram realizados dois ensaios para cada patógeno em casa-de-vegetação. O primeiro ensaio para *R. solanacearum* foi conduzido nos meses de fevereiro a março e o segundo, nos meses março a abril de 2011. Para FOL o primeiro ensaio foi mantido entre maio a junho e o segundo, nos meses de setembro a novembro, ambos em 2011.

Os tratamentos se constituíram de plantas advindas de sementes microbiolizadas com cada uma das rizobactérias, ou pulverização semanal com indutor abiótico acibenzolar-S-metil (produto comercial Bion®) na dosagem de 0,05 g.L⁻¹. As plantas foram cultivadas em copos plásticos de 700 mL, contendo substrato agrícola Carolina® não esterilizado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e uma planta por parcela.

Inoculação e avaliação de Ralstonia solanacearum

O isolado de *R. solanacearum* foi cultivado por 48 h a 28°C em meio 523 sólido (Kado & Heskett, 1970). Após o crescimento das colônias as células foram suspendidas em solução salina (0,85%) e a densidade ótica ajustada para $A_{540} = 0,5$ (concentração aproximada de 10^8 ufc.mL⁻¹). Aos 30 dias após a semeadura foi realizada a inoculação (uma planta/vaso) por meio de ferimentos nas raízes, através da inserção de uma faca no substrato na direção das mesmas, aproximadamente a 5 cm de distância do caule. Em seguida depositou-se, no local do ferimento, 5 mL por planta da suspensão do isolado RS-01. Uma testemunha submetida aos mesmos procedimentos, porém não inoculada, foi mantida para avaliação da alteração de matéria seca em relação às plantas inoculadas com patógeno. O tratamento com aplicação foliar de acibenzolar-S-metil (ASM) (Bion® 0,05 g.L⁻¹) foi iniciado 24 h antes da inoculação do patógeno e repetido em intervalos de sete dias, pulverizando as plantas até o ponto de escorrimento.

As avaliações foram realizadas após o aparecimento dos primeiros sintomas, sendo no primeiro ensaio aos 8, 10, 12 e 14 dias após a inoculação e no segundo, aos 12, 14, 16 e 18 dias, determinando se a porcentagem de folhas murchas (número de folhas murchas x 100 / número total de folhas da planta) (Silva et al., 2007). A etiologia da doença foi confirmada pelo reisolamento de *R. solanacearum* a partir de fragmentos de caule de plantas sintomáticas. Após as avaliações quanto à murcha, as plantas foram cortadas rente ao substrato, colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60 °C até atingir peso constante, para determinação do peso da matéria seca.

Inoculação e avaliação de F. oxysporum f. sp. lycopersici

Para produção de inóculo de FOL, o fungo foi cultivado em meio BDA por dez dias em placas de Petri. A suspensão de conídios foi preparada pela adição de 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa e raspagem da superfície com pincel para que os esporos se soltassem. A concentração da suspensão de esporos foi ajustada para 10^4 conídios.mL⁻¹.

As inoculações de FOL foram realizadas aos 30 dias após a semeadura usando a metodologia descrita anteriormente (uma planta/vaso). O tratamento com aplicação foliar de ASM foi iniciado 24 h antes da inoculação do patógeno e repetido em intervalos de sete dias. As avaliações foram realizadas após o aparecimento dos primeiros sintomas, iniciadas os 13 dias após a inoculação e repetidas num intervalo de cinco dias, pelo uso de uma escala de notas de sintomas de murcha cujas notas variam de 0 a 4 (Shanmugam & Kanoujia, 2011). Ao final deste período, foram retiradas porções do colo de plantas sintomáticas para o reisolamento do patógeno e confirmação da etiologia da doença.

Procedimento estatístico

Os valores de severidade de *R. solanacearum* e FOL foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). As médias dos valores de AACPD foram transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$, a fim de obter-se a normalidade e homogeneidade dos dados. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SASM-Agri®.

RESULTADOS

As rizobactérias mostraram atividade para as diferentes enzimas avaliadas. Para o teste de produção de quitinases, as rizobactérias DFs1296, DFs1315 e DFs1420 foram positivas, sendo que as duas primeiras também produziram amilases e lipases (Tabela 1). Apenas DFs1423 apresentou resultado positivo para o teste de solubilização de fosfato de cálcio. Em relação à atividade lipolítica, somente dois isolados (DFs1414 e DFs1420) não mostraram atividade positiva (Tabela 1).

TABELA 1- Atividade de rizobactérias selecionadas no biocontrole de *Ralstonia solanacearum* (RS) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). Antagonismo por antibiose em sobrecamada e inibição de crescimento micelial por compostos voláteis em placas sobrepostas. Atividade lítica em meios contendo quitina coloidal (quitinases) ou amido (amilases) ou Tween 80 (lipases) como únicas fontes de carbono e solubilização de fosfato de cálcio

| Isolado ¹ | Halo de antibiose RS | Crescimento micelial FOL (mm) | Produção de quitinases | Produção de amilases | Produção lipases | Solubilização de fosfato |
|----------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|------------------|--------------------------|
| Testemunha | | 41,7a ² | | | | |
| DFs1421 | + ³ | 39,2b (6,2) ⁴ | - | - | + | - |
| DFs1296 | + | 37,5b (10,0) | + | + | + | - |
| DFs1414 | + | 37,2b (10,8) | - | + | - | - |
| DFs1420 | + | 36,9b (11,5) | + | - | - | - |
| DFs1423 | + | 34,4c (17,5) | - | - | + | + |
| DFs1315 | + | 34,2c (18,1) | + | + | + | - |
| CV (%) | | 2,41 | | | | |

¹DFs1296 e DFs1315 (*Streptomyces* spp.), DFs1414, DFs1420 e DFs1423 (*Bacillus* spp.) e DFs1421 (*Pseudomonas* sp.);

²Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo com teste de Scott & Knott (p = 0,05);

³(+) = presença de halo; (-) = ausência de halo;

⁴Percentual de inibição considerando a testemunha tendo zero de inibição;

CV: coeficiente de variação.

As rizobactérias apresentaram comportamento variado quanto à capacidade para inibir o crescimento de *R. solanacearum* “in vitro”, sendo que dois destes isolados, DFs1414 e DFs1420 se destacaram por apresentar os maiores halos de inibição (dados não mostrados). Não foi observada inibição do crescimento micelial de FOL por meio de compostos não voláteis. Porém, quando se avaliou o efeito de compostos voláteis, produzidos pelas rizobactérias, houve redução significativa do crescimento micelial de FOL. A rizobactéria que apresentou maior percentual de redução de FOL foi DFs1315, seguido de DFs1423, com redução do crescimento micelial de 18,13 e 17,49%, respectivamente (Tabela 1).

No primeiro ensaio em casa-de-vegetação, visando o controle de *R. solanacearum*, as rizobactérias DFs1420 (*Bacillus* sp.) e DFs1421 (*Pseudomonas* sp.), bem como o indutor químico acibenzolar-S-metil (ASM) proporcionaram menor progresso da porcentagem de folhas murchas, formando um grupo distinto da testemunha (Figura 1). O

percentual de redução da AACPD proporcionada por estes três tratamentos variou 36,6 a 73,8%.

O segundo ensaio mostrou que o isolado DFs1421 de *Pseudomonas* sp., apresentou menor valor de AACPD (Figura 1). Os tratamentos com as rizobactérias DFs1414 e DFs1423 (*Bacillus* sp.) e com o indutor químico ASM também reduziram o progresso da murcha de folhas (Figura 1). Estes tratamentos formaram um grupo estatisticamente diferente da testemunha, cuja eficiência de controle variou de 64,5 a 91,7%.

De modo geral verificou-se a eficiência do isolado DFs1421 de *Pseudomonas* sp. e do indutor químico (ASM) em reduzir a murcha bacteriana, mostrando eficiência em ambos os ensaios.

A inoculação com *R. solanacearum* resultou em impacto negativo sobre o crescimento das plantas. No primeiro ensaio, a ocorrência da murcha reduziu significativamente a quantidade de matéria seca acumulada nas plantas inoculadas, contudo sem mostrar diferença

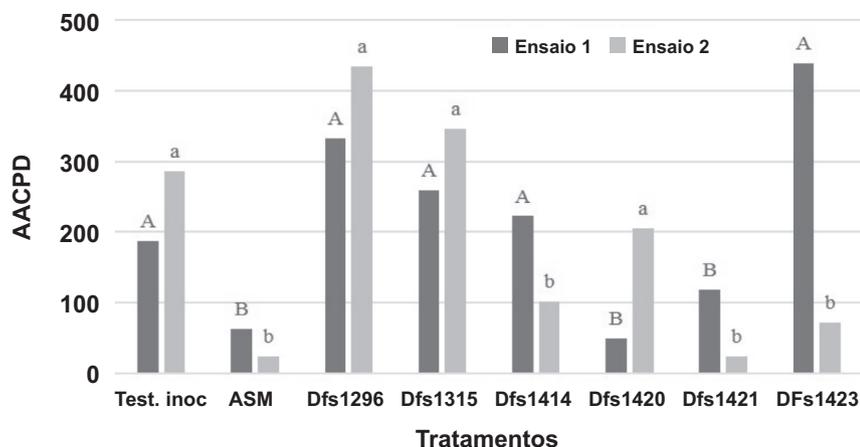


FIGURA 1- Efeito de rizobactérias [DFs1296 e DFs1315 (*Streptomyces* spp.), DFs1414, DFs1420 e DFs1423 (*Bacillus* spp.) e DFs1421 (*Pseudomonas* sp.)] e de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a área abaixo da curva do progresso da murcha bacteriana do tomateiro (AACPD) confrontado com a testemunha inoculada (Test. inoc.). Tratamentos com a mesma letra, para cada ensaio, pertencem ao mesmo grupo de acordo com teste de Scott & Knott (p = 0,05).

entre plantas originadas de sementes microbiolizadas com as rizobactérias ou não (Figura 2). No segundo ensaio, observou-se uma tendência à redução de matéria seca nas plantas inoculadas com patógeno, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas entre quaisquer tratamentos.

Os estreptomicetos DFs1296 e DFs1315 e *Bacillus* sp. (DFs1414), bem como pulverizações com o ASM proporcionaram reduções significativas da severidade da murcha de fusário, tanto no primeiro, como no segundo ensaio (Tabela 2). A intensidade da redução nos diferentes ensaios variou, havendo em ambos a formação de três grupos estatisticamente distintos: tratamentos similares à testemunha (letra a), intermediários (letra b) e superiores (letra c). Quatro tratamentos se diferenciaram da testemunha nos dois ensaios. Os estreptomicetos (DFs1296 e DFs1315) formaram o grupo superior no primeiro ensaio com média de controle de 69,4% e no segundo, foram incluídos no grupo intermediário (54% de controle). Adicionalmente, o isolado DFs1421 de *Pseudomonas* sp., que se destacou no controle de *R. solanacearum*, controlou a murcha de fusário no segundo ensaio (grupo intermediário).

DISCUSSÃO

Embora as rizobactérias tenham mostrado certa diversidade quanto à produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou à promoção de crescimento, a capacidade de hidrolisar quitina é considerada mais relevante para um potencial agente de biocontrole, pois este é o principal composto da parede celular de fungos e nematóides (Agrios, 2005). Enzimas quitinolíticas produzidas por rizobactérias têm sido relacionadas ao controle biológico de várias doenças fúngicas (Ajit et al., 2006; Kishore & Pande, 2007; Hariprasad et al., 2011). Por outro lado, a habilidade de produzir outras enzimas pode também estar correlacionada à capacidade competitiva das bactérias que as possuem (Whipps, 2001).

A detecção de antibiose “in vitro” é um método que tem sido usado para seleção inicial de rizobactérias como possíveis agentes de biocontrole contra *R. solanacearum* (Moura & Romeiro, 1999; Lemessa & Zeller, 2007; Messiha et al., 2007.; Xue et al., 2009). No presente estudo, todas as rizobactérias produziram zona de inibição “in vitro” de *R. solanacearum*, portanto estes biocontroladores podem estar atuando por antibiose. No entanto, a sensibilidade aos compostos produzidos pelos biocontroladores pode variar em função do isolado patogênico. As bactérias DFs1296 e DFs1315 sob outros códigos (BF110 e BF022 respectivamente), quando estudadas por Moura & Romeiro (1999) apresentaram antibiose contra 15 e 8% dos 52 isolados de *R. solanacearum* classificados como diferentes raças/biovars e oriundos de diferentes hospedeiros, coletados em diversas regiões do Brasil e do mundo.

Compostos não voláteis produzidos pelas rizobactérias não foram capazes de inibir o crescimento micelial de FOL “in vitro”. Isto também foi observado por Deuner (2004), para os mesmos isolados destas rizobactérias. Entretanto, quando se avaliou a produção de compostos voláteis, todas as rizobactérias utilizadas no presente trabalho foram capazes de reduzir o crescimento micelial de FOL, embora em diferentes intensidades. Mariano (1993) ressalta que diferentes metodologias e suas variantes, podem resultar em alteração da sensibilidade do ensaio. Portanto, não se pode descartar a possibilidade destas rizobactérias poderem também produzir compostos antibióticos não voláteis, quando presente no solo ou colonizando as raízes das plantas.

Nos ensaios em casa-de-vegetação visando o controle de *R. solanacearum*, as rizobactérias DFs1414, DFs1420 e DFs1423 (*Bacillus* sp.) apresentaram eficiência variada em relação aos dois ensaios, realizados no mesmo local, porém, em épocas diferentes. Condições ambientais, como temperatura e umidade têm influência sobre a eficácia do biocontrole (Guo et al., 2004; Jung et al., 2008). Agentes de biocontrole ainda têm mostrado certa

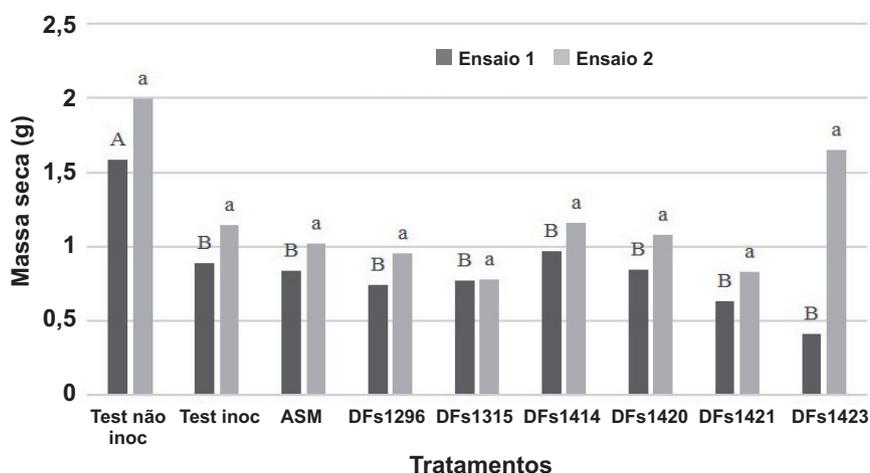


FIGURA 2 - Efeito de rizobactérias [DFs1296 e DFs1315 (*Streptomyces* spp.), DFs1414, DFs1420 e DFs1423 (*Bacillus* spp.) e DFs1421 (*Pseudomonas* sp.)] e de acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a massa seca final da parte aérea produzida por tomateiros inoculados com *Ralstonia solanacearum* confrontados com as testemunhas não inoculada (Test. não inoc.) e inoculada (Test. inoc.). Tratamentos com a mesma letra, para cada ensaio, pertencem ao mesmo grupo de acordo com teste de Scott & Knott ($p=0,05$).

TABELA 2- Severidade da murcha de fusário em plantas de tomateiro inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM)¹ ou provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias

| Tratamentos ² | Ensaio 1 | | Ensaio 2 | |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|----------|---------------|
| | AACPD ³ | % de controle ⁴ | AACPD | % de controle |
| DFs1423 | 30,63a ⁵ | 0 | 28,2a | 10 |
| Testemunha ⁶ | 30,00a | 0 | 31,3a | 0 |
| DFs1420 | 30,63a | 0 | 23,2b | 26 |
| DFs1421 | 28,13a | 8,2 | 23,8b | 24 |
| DFs1414 | 23,80b | 22,5 | 7,5c | 76 |
| ASM | 18,80b | 38,8 | 10,0c | 68 |
| DFs1296 | 9,40c | 69,4 | 13,3b | 58 |
| DFs1315 | 9,40c | 69,4 | 15,7b | 50 |
| C.V. (%) | 9,34 | | 14,04 | |

¹Acibenzolar-S-metil, produto comercial Bion 500 WG® 0,05 g.L;

²DFs1296 e DFs1315 (*Streptomyces* spp.), DFs1414, DFS1420 e DFs1423 (*Bacillus* spp.) e DFs1421 (*Pseudomonas* sp.);

³Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD);

⁴Percentual de controle considerando a testemunha (solução salina) 0% de controle;

⁵Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo de acordo com o teste de Scott & Knott (p = 0,05);

⁶Testemunha tratada com solução salina

CV: coeficiente de variação.

instabilidade na supressão de doenças e em alguns casos a efetividade ocorre apenas quando as condições para o desenvolvimento da doença são menos favoráveis (Jung et al., 2008). Isto foi observado no caso da rizobactéria DFs1423, em que sua eficácia de controle ocorreu apenas no ensaio 2, realizado no mês de abril, quando as condições de temperatura, no Rio Grande de Sul, são mais amenas e portanto menos favorável ao desenvolvimento de *R. solanacearum*. No entanto, a microbiolização das sementes com a rizobactéria DFs1421 (*Pseudomonas* sp.) foi estável, reduzindo a severidade da murcha bacteriana do tomateiro em ambos os ensaios em condições de casa-de-vegetação. A utilização de rizobactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* como agentes de biocontrole tem mostrado resultados positivos no manejo da murcha bacteriana (Anith & Momol, 2004; Vanitha et al., 2009; Wei et al., 2011). Estes agentes de biocontrole podem agir principalmente, por antagonismo direto contra *R. solanacearum* ou por indução de resistência sistêmica como mostrado em trabalhos conduzidos para identificação do modo de ação de rizobactérias (Haas & Défago, 2005). *Ralstonia solanacearum* é um patógeno habitante do solo e a efetiva colonização do sistema radicular por agentes de biocontrole pode evitar o ataque do patógeno no sítio de infecção e a posterior invasão do sistema vascular (Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010). Portanto, a atividade antagonista apresentada “in vitro” pelas rizobactérias pode ter um papel importante na redução da murcha bacteriana.

A aplicação das rizobactérias DFs1296, DFs1315 e DFs1414 reduziu significativamente a murcha de fusário em casa-de-vegetação, em ambos os ensaios. Rizobactérias pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* são importantes habitantes da rizosfera e podem apresentar a capacidade de reduzir a intensidade de doenças,

principalmente podridões de raiz e murchas (Whipps, 2001). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de outros pesquisadores, que demonstraram que determinadas rizobactérias Gram positivas apresentaram capacidade de reduzir a murcha de fusário (Son et al., 2009; Shanmugam & Kanoujia, 2011).

Rizobactérias podem estimular os mecanismos de defesa das plantas (Van Loon et al., 1998) ou ter ação direta contra FOL (Chandel et al., 2010). Pesquisadores reconhecem que a produção de quitinases é mecanismo importante na inibição de FOL (Hariprasad et al., 2011). No presente estudo, os isolados DFs1296 e DFs1315 apresentaram atividade quitinolítica e esta pode estar associada à diminuição dos sintomas de murcha de fusário nos ensaios “in vivo”. Adicionalmente, compostos voláteis produzidos por rizobactérias podem atravessar a parede da célula fúngica e induzir alterações na permeabilidade da membrana plasmática (Li et al., 2012). Portanto, a antibiose mediada por estes compostos, observada para as rizobactérias aqui estudadas pode também ter contribuído para redução da intensidade da murcha de fusário.

Os níveis de controle obtidos com a utilização das rizobactérias, para ambas as murchas, foram iguais aos proporcionados pelo indutor químico de resistência ASM, relatado como eficiente na redução destas doenças (Anith & Momol, 2004). Embora o controle de *R. solanacearum* e FOL possa estar relacionado à antibiose apresentada pelas rizobactérias aqui estudadas, existe também a possibilidade do envolvimento de indução de resistência. Esta ideia ganha força no fato de que a proteção conferida por estas rizobactérias não é específica, uma vez que as mesmas apresentaram atividade tanto contra os patógenos incluídos no presente trabalho, quanto para patógenos diferentes, avaliados em outros trabalhos (Moura et al., 1998; Naue,

2009). Tal abrangência de efeito de controle é de ocorrência comum na indução de resistência (Schonbeck et al., 1993).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado a D. J. A. Rocha. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a A. B. Moura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5ª Ed. Amsterdam The Netherlands. Elsevier Academic Press.
- Ajit NS, Verma R, Shanmugam V (2006) Extracellular chitinase of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Current Microbiology* 52:310-316.
- Anith KN, Momol MT (2004) Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl, and soil amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. *Plant Disease* 88:669-673.
- Chandel S, Eunice J, Allan EJ, Woodward S (2010) Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. *Journal of Phytopathology* 158:470-478.
- Deuner CC (2004) Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas RS.
- Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* 29:66-72.
- Haas D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3:307-319.
- Hariprasad P, Divakara ST, Niranjana SR (2011) Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of *Fusarium* wilt in tomato. *Crop Protection* 30:1606-1612.
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87.
- Jung WJ, Mabood F, Souleimanov A, Zhou XM, Jaoua S, Kamoun F, Smith DL (2008) Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 1836-1840.
- Kado CI, Heskett MS (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976.
- Kishore GK, Pande S (2007) Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of *Botrytis* gray mold disease in chickpea under controlled conditions. *Letters in Applied Microbiology* 44:98-105.
- Kurozawa C, Pavan MA (2005) Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças de Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres. p. 607-626.
- Lemessa F, Zeller W (2007) Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42:336-344.
- Li Q, Ning P, Zheng L, Huang J, Guoqing L, Hsiang T (2012) Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control* 61:113-120.
- Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do tomateiro. 2ª Ed. Brasília DF. Embrapa Hortaliças.
- Mariano RLR (1993) Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1:369-409.
- Mariano RLR, Silveira EB (2005) Manual de Práticas em Fitobacteriologia. Recife PE. UFRPE.
- Messiha N, Van Diepeningen A, Farag N, Abdallah S, Janse J, Van Bruggen A (2007) *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *European Journal of Plant Pathology* 118:211-225.
- Moura AB, Romeiro RS (1999) Avaliação “in vitro” de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). *Ciência e Agrotecnologia* 23:281-288.
- Moura AB, Romeiro RS, Neves MCP (1998) Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 3:2065-2072.
- Naue CR (2009) Rizobactérias promotoras de crescimento: controle de patógenos, promoção de crescimento e reflexos na qualidade do fruto do tomateiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas RS.
- Nguyen MT, Ranamukhaarachchi SL (2010) Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology* 92:395-405.
- Reis A, Costa H, Boiteux LS, Lopes CA (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 30:426-428.
- Romeiro RS (2007) Controle Biológico de Doenças de Plantas: Procedimentos. Viçosa MG. Editora UFV.
- Schonbeck F, Steiner U, Kraska T (1993) Induced resistance - criteria, mechanisms, practical application and estimation. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz - Journal of Plant Diseases and Protection* 100:541-557.
- Shanmugam V, Kanoujia N (2011) Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control* 57:85-93.
- Silva RF, Pascholati SF, Bedendo IP (2007) Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* 32:189-196.
- Son SH, Khan Z, Kim SG, Kim YH (2009) Plant growth-

promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. *Journal of Applied Microbiology* 107:524-532.

Thanh DT, Tarn LTT, Hanh NT, Tuyen NH, Bharathkumar S, Lee SV, Park KS (2009) Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in vietnam. *Plant Pathology Journal* 25:263-269.

Van Loon LC, Bakker P, Pieterse, CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.

Vanitha SC, Niranjana SR, Mortensen CN, Umesha S (2009) Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol* 54:685-695.

Wei Z, Yang X, Yin S, Shen Q, Ran W, Xu Y (2011) Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Applied Soil Ecology* 48:152-159.

Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511.

Xue QY, Chen Y, Li SM, Chen LF, Ding GC, Guo DW, Guo JH (2009) Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control* 48:252-258.

TPP 604 - Recebido 24 Abril 2012 - Aceito 18 Julho 2013
Editor de Seção: Bernardo A. Halfeld-Vieira