

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE E INIBIÇÃO *IN VITRO* DE *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, AGENTE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO¹

Control with endophytic bacteria and *in vitro* inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agent of bacterial speck of tomato

Juliana Resende Campos Silva², Ricardo Magela de Souza³, Ana Beatriz Zacarone⁴, Luis Henrique Carregal Pereira da Silva², Ana Maria dos Santos Castro⁵

RESUMO

Para avaliar o potencial de 53 isolados de bactérias endofíticas no controle da pinta bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), realizaram-se seleções massais em casa-de-vegetação e a seguir foi avaliado, *in vitro*, o antagonismo desses isolados sobre a bactéria desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). A inoculação das bactérias endofíticas foi feita por microbiolização das sementes de tomate cv. Santa Clara e da desafiante (Pst) por pulverização. Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação da Pst, foram realizadas as avaliações da severidade da pinta bacteriana, bem como da altura das plantas. As espécies e os isolados bacterianos mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana foram: *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10), *Bacillus pumilus* (isolados 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolados 37 e 47), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolado 45), *B. amyloliquefaciens* (isolado 50), TOM 2, TOM 24 e *Staphylococcus aureus* (isolado 18). Mais de 50% dos isolados eficazes na redução da severidade foram da espécie *Bacillus pumilus*. Das espécies endofíticas mais eficazes na redução da severidade da pinta bacteriana, *Bacillus pumilus* e *B. amyloliquefaciens* inibiram também o crescimento da Pst *in vitro*. Vários dos isolados promoveram também o crescimento das plantas.

Termos para indexação: Bactérias endofíticas, controle biológico, pinta bacteriana, tomate.

ABSTRACT

To assess the potential of fifty three isolates of endophytic bacteria on the control of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), several screening were done in greenhouse followed by *in vitro* studies on antagonism of those isolates to Pst. The inoculation of endophytic bacteria was done by microbiolization of tomato cv Santa Clara seeds. The challenging bacterium (Pst) inoculation was done by spraying. At 7, 14 and 21 days after Pst inoculation the assessment of bacterial speck severity was done, and height of plants was also measured. The most efficient endophytic species and isolates in reducing disease severity were: *Acinetobacter johnsonii* (isolate 10), *Bacillus pumilus* (isolates, 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolates, 37, 47), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolate 45), *B. amyloliquefaciens* (isolate 50), TOM 2, TOM 24 and *Staphylococcus aureus* (isolate 18). More than 50% of the endophytic isolates efficient in reducing disease severity belonged to *Bacillus pumilus*. From the most efficient endophytic species group, the species *Bacillus pumilus* and *B. amyloliquefaciens* inhibited the Pst growth *in vitro*. Several bacterial isolates promoted growth of tomato.

Index terms: Endophytic bacteria, biological control, bacterial speck, tomato.

(Recebido em 2 de março de 2005 e aprovado em 20 de outubro de 2006)

INTRODUÇÃO

A pinta bacteriana causada pela *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pst) (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 é uma doença economicamente importante para o tomate, em condições ambientais propícias para a infecção, exigindo medidas de controle em áreas infestadas (LOPES, 2001), pois reduz a produtividade pela destruição de tecido foliar e pela derrubada de frutos em formação.

Além disso, compromete a qualidade e o valor comercial dos frutos (LOPES & SANTOS, 1994). A pinta bacteriana tem sido uma das principais doenças sob condições de baixa temperatura e alta umidade, podendo causar perdas de até 30% na produção (SILVA & LOPES, 1995).

A eficácia da disseminação pelas sementes (JONES, 1993) e penetração por estômatos, hidatódios e ferimentos ocorridos durante os tratamentos culturais (MOURA & OLIVEIRA, 1996), aliada às condições ambientais propícias

¹Parte da dissertação de mestrado em Agronomia/Fitopatologia da primeira autora apresentada à UFLA.

²Engenheiros Agrônomos, Mestres em Fitopatologia, Professores – Departamento de Agronomia-Fitopatologia – Universidade de Rio Verde/FESURV – Fazenda Fontes do Saber – Cx. P. 104 – 75901-970 – Rio Verde, GO – jucampos@ufla.br; lhcarregal@uol.com.br

³Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Professor – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – rmaleas@ufla.br – Bolsista CNPq

⁴Engenharia Agrônoma – Departamento de Engenharia/DEG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ana_zacaroni@yahoo.com.br – Bolsista iniciação científica PIBIC/CNPq

⁵Bióloga – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – anamdcastro@gmail.com

(KIMURA & CARMO, 1996; MOURA & OLIVEIRA, 1996) têm exigido do produtor a utilização de práticas de controle.

O controle de doenças bacterianas tem a limitação quanto à disponibilidade de produtos químicos. Nesse caso, são usados apenas alguns poucos antibióticos, além de outros produtos de ação bactericida ou de indução de resistência, contudo, a tendência é utilizar produtos de baixa toxicidade. Uma nova opção no controle de fitobactérias tem sido o biológico, o qual vem recebendo bastante atenção, por se tratar de um método natural, sem causar impactos ao ambiente e efeitos toxicológicos. Alguns trabalhos têm sido feitos com bactérias endofíticas, as quais têm se mostrado agentes eficientes de controle em patossistemas, como *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* -arroz, *X. axonopodis* pv. *citri-citros*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* - batata e *X. campestris* pv. *campestris* - repolho (ASSIS et al., 1998; BUREN et al., 1993; STURTZ & MATHESON, 1996).

Colin & Chafik (1986) relataram que aplicações semanais de suspensão de células de dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* controlou a *Pst* em tomate com igual eficiência ao tratamento com compostos cúpricos. Foi observada ainda a ocorrência de leve efeito residual, o que pode ser explicado pela capacidade das bactérias de manter população epifítica residual nas folhas de tomate. Carrer Filho et al. (2002) obtiveram controle eficiente da mancha e pinta bacteriana do tomateiro com a utilização de um isolado de actinomiceto, em casa-de-vegetação. Halfeld-Vieira et al. (2001) conseguiram controle eficiente da mancha e pinta bacterianas do tomateiro com a utilização do isolado bacteriano UFV-IEA6 do filoplano. Silva et al. (2001) obtiveram alguns isolados de rizobactérias com aparente atividade de indução de resistência sistêmica à *Pst*, dada à separação espacial entre os antagonistas e o patógeno. Halfeld-Vieira et al. (2001) conseguiram bom controle da pinta bacteriana com 3 isolados de bactérias do filoplano do tomateiro. Neves et al. (2004), citados por Romeiro & Macagnan (2004), obtiveram controle da pinta bacteriana do tomateiro com a aplicação do isolado UFV-101 em folhas por atomização.

Como ainda são escassas as pesquisas relativas ao controle biológico da pinta bacteriana do tomateiro, a busca por isolados bacterianos endofíticos continua, com o objetivo de se obter agentes potenciais mais eficazes ao controle dessa enfermidade. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho selecionar isolados de bactérias endofíticas de diferentes espécies e gêneros obtidas de folhas e haste de tomateiro e pimentão para o controle da pinta bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e estudar a

capacidade desses isolados em produzir metabólitos tóxicos a *Pst in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se diversas espécies e gêneros de bactérias endofíticas isoladas de hastes e folhas de tomate e pimentão, identificadas pela análise de ácidos graxos em cromatógrafo a gás e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a utilização nos ensaios.

Seleção, em casa de vegetação, de bactérias endofíticas para o controle da pinta bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas

Cinquenta e três isolados de bactérias endofíticas, preservados em meio líquido peptona-glicerol em ultrafreezer a -80°C, foram transferidos para placas de Petri contendo meio "tryptic soy agar" (TSA) e incubados a 28°C em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões com esses isolados, adicionando-se às placas solução salina de MgSO₄ 0,1M e homogeneizando-se com auxílio de alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada em espectrofotômetro para T_{580nm} = 20% (aproximadamente 10⁸ ufc/mL).

Para a microbiolização, sementes de tomateiro Santa Cruz Kadá foram desinfestadas superficialmente por meio de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e, em seguida, enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Após secagem sobre papel de filtro, as sementes foram imersas nas suspensões bacterianas por 24 horas. A testemunha foi imersa somente na solução salina. A seguir, as sementes bacterizadas foram deixadas por 2 horas para secar em papel de filtro e semeadas em bandejas, contendo substrato plantmax. O transplante foi realizado 20 dias após a semeadura, deixando-se 4 plantas por vaso.

Aos 28 dias após a semeadura, realizou-se a inoculação das mudas por pulverização das folhas até o ponto de escorrimento, com suspensão de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) na concentração de 10⁸ ufc/mL (A540nm = 0.2). As plantas permaneceram por 24 horas antes e 24 horas após a inoculação em câmara úmida, sendo posteriormente transferidas para a casa-de-vegetação. Os primeiros sintomas foram observados cerca de 8 dias após a inoculação.

Cinquenta e um isolados foram testados na primeira seleção massal em três ensaios empregando-se 19, 18 e 14 isolados, respectivamente (Tabelas 1, 2 e 3), conduzidos em casa-de-vegetação em delineamento de blocos casualizados. Na segunda seleção massal, os 27 melhores

Tabela 1 – Redução da severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) do tomateiro por diferentes isolados de bactérias endofíticas (Ensaio 1).

Isolados	Severidade (%)		% de controle	
	1ª Aval	2ª Aval	1ª Aval	2ª Aval
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (10)	14,20 a	17,85 a	33,26 a	41,09 a
<i>B. pumilus</i> (12)	11,45 a	18,00 a	46,18 a	40,60 a
<i>Paenibacillus macerans</i> (37)	22,40 b	18,55 a	0,00 b	38,78 a
<i>B. pumilus</i> (39)	27,15 c	18,65 a	0,00 c	38,45 a
<i>B. pumilus</i> (20)	15,00 a	18,75 a	29,50 a	38,12 a
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (1)	15,00 a	18,90 a	29,50 a	37,63 a
<i>Paenibacillus macerans</i> (15)	17,75 a	19,30 a	16,57 a	36,31 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (36)	26,95 c	19,45 a	0,00 c	35,81 a
<i>B. pumilus</i> (3)	14,30 a	20,20 a	32,79 a	33,34 a
<i>B. pumilus</i> (6)	12,80 a	20,35 a	39,84 a	32,84 a
<i>B. pumilus</i> subg. B (27)	12,85 a	22,00 a	39,60 a	27,40 a
<i>B. megaterium</i> (7)	16,80 a	22,20 a	21,04 a	26,74 a
Tom 4	16,25 a	23,10 b	23,62 a	23,77 b
<i>B. pumilus</i> (8)	14,20 a	23,70 b	33,26 a	21,79 b
<i>Paenibacillus macerans</i> (14)	20,95 b	24,30 b	1,53 b	19,81 b
<i>Pseudomonas putida</i> (17)	19,95 b	24,35 b	6,23 b	19,64 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (21)	24,90 c	24,50 b	0,00 c	19,15 b
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (9)	16,10 a	25,35 b	24,33 a	16,34 b
<i>Bacillus pumilus</i> subg. B (26)	24,40 c	26,10 b	0,00 c	13,87 b
Testemunha	21,25 b	29,95 b	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

isolados e espécies foram testados novamente em um único ensaio (Tabela 7). Tanto na primeira, como na segunda seleção massal, as avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação da bactéria desafiante (Pst), seguindo-se a escala de Sidhu & Webster (1977).

Avaliou-se também a promoção do crescimento das plantas, medindo-se a altura da parte aérea até o coleto, com uma régua graduada nas mesmas datas anteriormente citadas.

Os dados foram analisados pelo programa SISVAR 4.2 e as médias comparadas pelo Teste de Scott & Knott (1974).

Atividade antagonista *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)

Cinquenta e três isolados bacterianos endofíticos foram cultivados em meio líquido 523 de Kado & Heskett

(1970), por 24 horas, a 28°C. Placas de petri com meio 523 sólido foram preparadas e semeadas com as bactérias endofíticas em quatro pontos equidistantes. Cada isolado endofítico foi semeado em cinco placas com uma alça de repicagem e incubado a 28°C/16h para *Bacillus* sp. e por 24 horas para os demais gêneros, tempos estes suficientes para as colônias apresentarem crescimento evidente. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram invertidas, sendo colocado na tampa de cada uma, 1 ml de clorofórmio, por 30 minutos. As placas foram então entreabertas e deixadas por mais 30 minutos para a volatilização do clorofórmio. Em seguida, cada placa recebeu uma sobrecamada de meio semi-sólido 523 fundente, ao qual foi incorporado 0,1 ml de suspensão da bactéria Pst e incubadas a 28°C. Após 48 horas, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição do crescimento de Pst pelos 53 isolados bacterianos endofíticos testados.

Tabela 2 – Redução da severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) do tomateiro por diferentes isolados de bactérias endofíticas (Ensaio 2).

Isolados	Severidade (%)			% de controle		
	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
Pim 11	9,70 a	11,60 a	14,20 a	49,26 a	30,16 a	44,33 a
<i>B. cereus</i> (13)	10,20 a	15,82 b	19,90 b	53,34 a	4,76 b	21,99 b
<i>P. macerans</i> (47)	10,97 a	15,80 b	14,12 a	42,62 a	4,88 b	44,64 a
<i>B. sphaericus</i> (45)	11,02 a	16,47 b	14,92 a	42,36 a	0,85 b	41,51 a
<i>B. sphaericus</i> (42)	11,40 a	14,45 b	15,20 a	40,37 a	13,01 b	40,41 a
<i>B. pumilus</i> (48)	11,60 a	13,40 a	20,65 b	39,33 a	19,33 a	19,05 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (50)	12,40 a	13,15 a	16,67 a	35,14 a	20,83 a	34,65 a
<i>B. subtilis</i> (31)	13,92 a	15,55 b	26,52 b	27,19 a	6,38 b	3,95 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (41)	14,32 b	18,75 c	23,25 b	25,10 b	12,87 c	8,86 b
<i>B. pumilus</i> (52)	15,10 b	15,70 b	22,82 b	21,02 b	5,48 b	10,54 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (32)	15,35 b	16,77 b	17,10 a	19,71 b	0,95 b	32,96 a
<i>B. sphaericus</i> (54)	15,65 b	15,72 b	21,20 b	18,15 b	5,36 b	16,89 b
Pim 19	16,45 b	16,27 b	23,52 b	13,96 b	20,50 b	7,80 b
<i>B. sphaericus</i> (53)	16,65 b	21,62 d	23,65 b	12,92 b	0,00 d	7,40 b
Tom 35	17,40 c	15,10 b	22,30 b	8,99 c	9,09 b	12,58 b
<i>B. pumilus</i> (49)	18,12 c	22,30 d	25,40 b	5,23 c	0,00 d	0,43 b
<i>C. luteum</i> (16)	18,06 c	19,95 c	25,97 b	5,54 c	0,00 c	0,00 b
Tom 38	19,75 c	18,75 c	24,17 b	3,29 c	0,00 c	5,25 b
Testemunha	19,10 c	16,60 b	25,50 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção, em casa de vegetação, de bactérias endofíticas para o controle da pinta bacteriana do tomateiro e promoção do crescimento das plantas

Primeira seleção massal

No primeiro ensaio, na avaliação feita sete dias após a inoculação da Pst, observou-se que doze isolados endofíticos reduziram significativamente a severidade da pinta bacteriana. A segunda avaliação, feita quatorze dias após a inoculação da Pst, demonstrou significativa redução na severidade da pinta bacteriana pelas espécies *Acinetobacter johnsonii* (isolados 1 e 10), *Paenibacillus macerans* (isolados 15 e 37), *Bacillus pumilus* (isolados 3, 6, 12, 20, 27 e 39), *B. amyloliquefaciens* (isolado 36), *B. megaterium* (isolado 7) em relação à testemunha. A porcentagem de controle variou de 26,74% a 41,09% em relação à testemunha (Tabela 1). No segundo ensaio, os

melhores isolados foram selecionados na 1ª, na 2ª e na 3ª avaliações. Dessa forma, os melhores tratamentos foram PIM 11, *Paenibacillus macerans* (isolado 47), *Bacillus sphaericus* (isolados 42 e 45), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 50). A porcentagem de controle variou entre 34,6% e 44,6% (Tabela 2). No terceiro ensaio, os melhores isolados foram selecionados quando a severidade foi diferente ($P < 0,05$) da testemunha nas três avaliações. Dessa forma, os melhores foram *Paenibacillus macerans* (isolado 29), *Microbacterium liquefaciens* (*Aureobacterium liquefaciens*) (isolado 34), TOM (isolados 2, 23, 24 e 25), *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 28) e *Bacillus pumilus* (isolado 51), *B. sphaericus* (isolado 43), *Staphylococcus aureus* (isolado 18) (Tabela 7). Nos 3 ensaios, destacaram-se 27 isolados em que a severidade da pinta bacteriana foi menor ($P < 0,05$) do que a testemunha dentro do critério descrito (Tabelas 1, 2, 3).

A altura das plantas foi afetada pela inoculação de algumas bactérias endofíticas. No primeiro ensaio, maior

Tabela 3 – Redução da severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) do tomateiro por diferentes isolados de bactérias endofíticas (Ensaio 3).

Isolados	Severidade (%)			% de controle		
	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval	1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
<i>P. macerans</i> subg B (29)	11,57 a	22,40 a	19,20 a	51,63 a	40,64 a	42,78 a
<i>M. liquefaciens</i> (34)	12,42 a	23,90 a	20,90 a	48,08 a	36,66 a	37,71 a
Tom 2	13,10 a	23,65 a	21,30 a	45,24 a	37,32 a	36,52 a
<i>S. aureus</i> (18)	13,32 a	24,32 a	21,02 a	44,32 a	35,55 a	37,36 a
<i>B. sphaericus</i> (43)	14,27 a	21,32 a	18,20 a	40,35 a	43,50 a	45,76 a
Tom 23	14,27 a	24,30 a	20,42 a	40,35 a	35,60 a	30,14 a
Tom 25	14,30 a	23,40 a	20,42 a	40,22 a	37,99 a	39,14 a
Tom 24	14,85 a	16,97 a	18,80 a	37,92 a	55,02 a	43,97 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (28)	15,00 a	23,65 a	18,67 a	37,30 a	37,32 a	44,36 a
<i>B. pumilus</i> (51)	15,05 a b	24,10 a	20,15 a	37,09 a	36,13 a	39,95 a
<i>M. kritinae</i> (33)	18,27 b	27,70 a	21,75 a	23,63 b	26,59 a	35,18 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (22)	18,87 b	22,22 a	19,82 a	21,12 b	41,11 a	40,93 a
<i>B. marinus</i> (44)	20,82 b	23,47 a	20,27 a	12,97 b	37,80 a	39,59 a
<i>P. gordonae</i> (40)	21,12 b	24,95 a	21,25 a	11,71 b	33,88 a	36,67 a
Testemunha	23,87 b	37,67 a	33,47 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

promoção de crescimento ocorreu quando o isolado 10 de *Acinetobacter johnsonii* foi inoculado no tomateiro. Entretanto, na primeira avaliação da altura, três isolados bacterianos, *Acinetobacter johnsonii* (10), TOM 4 e *B. pumilus* (39), promoveram ($P < 0,05$) o crescimento (Tabela 4). Nem todos os isolados que promoveram crescimento das plantas de tomateiro reduziram também a severidade da pinta bacteriana. O isolado TOM4 promoveu o crescimento, porém, num primeiro ensaio, não afetou a severidade da pinta bacteriana, necessitando, contudo, uma melhor investigação. Dois dos doze isolados que reduziram a severidade da doença também promoveram o crescimento das plantas em aproximadamente 9,5% para *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10) e 20,2% para *B. pumilus* (isolado 39) (Tabela 4).

No segundo ensaio, na primeira e segunda avaliações da altura, todos os isolados bacterianos utilizados promoveram o crescimento das plantas de tomateiro. Já na terceira avaliação, apenas 6 isolados dos 18 utilizados promoveram o crescimento das plantas, entre os quais 3 isolados, Pim 11, *B. cereus* (13) e *B. sphaericus* (45), promoveram o crescimento das plantas e, concomitantemente, reduziram a severidade da doença em 44,33%, 21,99% e 41,51%, respectivamente (Tabela 5).

No terceiro ensaio, a altura das plantas não diferiu entre os isolados testados e a testemunha (Tabela 6).

Segunda seleção massal

Dos 27 isolados endofíticos selecionados anteriormente, apenas 14 reduziram a severidade da pinta bacteriana ($P < 0,05$) em relação à testemunha nas 2ª e 3ª avaliações: *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10), *Bacillus pumilus* (isolados 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolados 37 e 47), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolado 45), *B. amyloliquefaciens* (isolado 50), TOM (isolado 2 e 24), *Staphylococcus aureus* (isolado 18) (Tabela 7). Portanto, mais de 50% deles foram espécies de *Bacillus*.

A porcentagem de severidade mais baixa da pinta bacteriana foi de 26,25% quando se aplicou *P. macerans* (isolado 47), correspondendo a 50,12% de controle em relação à testemunha, destacando-se como o melhor isolado no controle dessa fitobacteriose. Este isolado inibiu também o crescimento da Pst *in vitro*. Contudo, a severidade da doença variou de 26,25% a 38,75% nesse grupo mais promissor (Tabela 7).

Silva et al. (2004a) investigaram se as rizobactérias selecionadas para controle biológico de *Pseudomonas*

Tabela 4 – Efeito de diferentes isolados de bactérias endofíticas na altura de plantas de tomateiro.

Isolados	Altura (cm)	
	1ª Avaliação	2ª Avaliação
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (10)	19,00 a	24,70 a
<i>B. pumilus</i> (12)	17,80 b	24,15 a
<i>Paenibacillus macerans</i> (37)	14,35 c	21,55 b
<i>B. pumilus</i> (39)	20,85 a	23,70 a
<i>B. pumilus</i> (20)	16,80 b	23,35 a
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (1)	13,45 c	20,85 b
<i>Paenibacillus macerans</i> (15)	16,05 c	21,90 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (36)	15,60 c	22,25 b
<i>B. pumilus</i> (3)	15,90 c	22,30 b
<i>B. pumilus</i> (6)	14,70 c	20,85 b
<i>B. pumilus</i> subg. B (27)	16,55 b	22,00 b
<i>B. megaterium</i> (7)	14,45 c	20,30 b
Tom 4	18,95 a	24,25 a
<i>B. pumilus</i> (8)	15,15 c	22,20 b
<i>Paenibacillus macerans</i> (14)	15,65 c	23,15 a
<i>Pseudomonas putida</i> (17)	16,45 b	21,70 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (21)	15,00 c	21,35 b
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (9)	18,00 b	24,40 a
<i>Bacillus pumilus</i> subg. B (26)	16,70 b	23,25 a
Testemunha	17,35 b	23,30 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

syringae pv. *tomato* em tomateiro apresentavam também a característica de promoção de crescimento. Assim, foi observado que, para os antagonistas testados, não houve correspondência entre a capacidade de promover o crescimento de tomateiro e proteger as plantas contra o patógeno desafiante. Portanto, tais resultados reforçam a divisão, recentemente proposta, dessas bactérias em dois grupos: 1) as que têm potencial para o controle biológico e 2) as promotoras de crescimento. Nesse contexto, Silva et al. (2004a) testaram 28 isolados de rizobactérias para o controle da Pst e, destes, 10 reduziram a severidade em mais de 70%, havendo ainda destaque para dois isolados que reduziram a severidade em praticamente 80%, mas nenhum destes se caracterizou como promotor de crescimento.

Silva & Romeiro (2004) selecionaram 28 rizobactérias capazes de reduzir a severidade da pinta bacteriana em até 60% em relação ao controle. Fazendo dois novos ensaios,

foi possível selecionar apenas um isolado, UFV-101 – *Bacillus cereus*, que se manteve efetivo. Para explorar melhor o espectro de ação desta espécie, Silva et al. (2004b) provaram a sua eficiência também no controle de *Alternaria solani*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium*, *Stemphylium solani* e *Corynespora cassiicola*, caracterizando este isolado como um possível indutor de resistência.

Inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e relação com o controle da pinta bacteriana do tomateiro

Dos 52 isolados testados apenas 23 inibiram o crescimento de Pst *in vitro*. Desses, *Bacillus pumilus* (isolados 3, 12, 20, 39, 51), *Paenibacillus macerans* (isolados 37 e 47) e *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 50) reduziram ($P < 0,05$) a severidade da pinta bacteriana na última seleção (Tabela 4). Dessa forma, pode-se supor que entre outros mecanismos de controle biológico, esses

Tabela 5 – Efeito de diferentes isolados de bactérias endofíticas na altura de plantas de tomateiro (Ensaio 2).

Isolados	Altura (cm)		
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
Pim 11	26,10 c	36,70 c	50,30 b
<i>B. cereus</i> (13)	27,80 c	39,30 c	54,40 b
<i>P. macerans</i> (47)	23,33 b	31,53 b	42,19 a
<i>B. sphaericus</i> (45)	27,00 c	37,40 c	50,00 b
<i>B. sphaericus</i> (42)	24,49 b	34,24 b	46,26 a
<i>B. pumilus</i> (48)	26,30 c	35,90 c	44,85 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (50)	24,65 b	33,80 b	45,50 a
Tom 31	24,33 b	32,06 b	40,26 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (41)	22,99 b	32,93 b	49,29 b
<i>B. pumilus</i> (52)	27,10 c	36,80 c	46,60 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (32)	26,80 c	34,70 b	43,60 a
<i>B. sphaericus</i> (54)	26,00 c	35,80 c	52,40 b
Pim 19	23,90 b	33,80 b	46,20 a
<i>B. sphaericus</i> (53)	26,80 c	33,60 b	42,74 a
Tom 35	27,00 c	37,10 c	48,90 b
<i>B. pumilus</i> (49)	26,05 c	33,80 b	41,20 a
<i>C. luteum</i> (16)	23,36 b	32,11 b	40,48 a
Tom 38	27,70 c	35,55 c	44,33 a
Testemunha	17,40 a	25,15 a	36,33 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

isolados atuam também por antibiose sobre Pst, isto é, por inibição direta do seu crescimento nos tecidos foliares). Por outro lado, isolados, como, *Acinetobacter johnsonii* (isolado 10), PIM 11, *Bacillus sphaericus* (isolado 45), TOM (isolados 2 e 24) e *Staphylococcus aureus* (isolado 18) provavelmente reduziram a severidade da pinta bacteriana (Tabela 4) pela indução de resistência na planta de tomate, pois, não foram caracterizados como antagonistas a Pst. Entretanto, a quantidade de substâncias inibidoras *in vitro* parece não ter relação com a capacidade do isolado endofítico em reduzir a severidade da doença, pois isolados com baixa (+), média (++) e alta (+++) capacidade de inibição reduziram a severidade da pinta bacteriana na mesma intensidade (Tabela 8). Portanto, os dois métodos de atuação das bactérias, provavelmente ocorreram nos isolados mais eficazes aqui testados.

Romeiro et al. (2000) também correlacionaram a inibição “in vitro” com a severidade da pinta bacteriana,

pois, dos três isolados bacterianos do filoplano selecionados em função do diâmetro do halo de inibição, dois proporcionaram controle estatisticamente significativo.

Guo et al. (1996, 2001) selecionaram os isolados de rizobactérias promotoras de crescimento como promissores agentes de biocontrole pela combinação do halo de inibição formado e a capacidade de crescimento nas raízes. Os isolados *Serratia* sp., *Pseudomonas* e *Bacillus* sp., produtores de halo de inibição, foram testados por Guo et al. (2004) no controle da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, chegando a atingir de 63,3% a 94,1% de controle e aumento da produtividade de 46,3% a 78,5%. Em função do bom desempenho destes isolados, ensaios com formulações foram realizados no período de dois anos, observando-se estabilidade e manutenção das características de biocontrole.

Tabela 6 – Efeito de diferentes isolados de bactérias endofíticas na altura de plantas de tomateiro (Ensaio 3).

Isolados	Altura (cm)		
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
<i>P. macerans</i> subg B (29)	21,40 a	33,11 a	39,29 a
<i>M. liquefaciens</i> (34)	20,25 a	30,85 a	36,00 a
Tom 2	20,96 a	31,56 a	37,73 a
<i>S. aureus</i> (18)	19,40 a	34,00 a	40,00 a
<i>B. sphaericus</i> (43)	22,50 a	32,65 a	36,90 a
Tom 23	21,48 a	32,30 a	36,88 a
Tom 25	21,11 a	31,21 a	36,76 a
Tom 24	22,75 a	34,43 a	39,10 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (28)	19,60 a	31,61 a	37,40 a
<i>B. pumilus</i> (51)	21,65 a	31,75 a	37,00 a
<i>K. kritinae</i> (33)	23,50 a	34,15 a	39,15 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (22)	22,10 a	32,05 a	36,40 a
<i>B. marinus</i> (44)	20,73 a	30,55 a	35,40 a
<i>P. gordonae</i> (40)	21,95 a	31,18 a	36,31 a
Testemunha	21,70 a	29,73 a	34,03 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Redução da severidade da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) do tomateiro pelos 27 melhores isolados bacterianos endofíticos previamente selecionados.

Isolados	Severidade (%)		% de controle	
	2ª Aval	3ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (10)	30,00 a	32,50 a	44,20 a	38,25 a
<i>B. pumilus</i> (12)	33,75 a	32,50 a	37,22 a	38,25 a
<i>Paenibacillus macerans</i> (37)	29,55 a	32,50 a	45,00 a	38,25 a
<i>B. pumilus</i> (39)	37,50 a	33,75 a	30,25 a	35,87 a
<i>B. pumilus</i> (20)	38,75 a	26,25 a	27,92 a	50,12 a
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (1)	33,75 a	36,25 b	37,22 a	31,12 b
<i>Paenibacillus macerans</i> (15)	33,75 a	38,75 b	37,22 a	26,37 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (36)	32,50 a	38,75 b	39,55 a	26,37 b
<i>B. pumilus</i> (3)	28,75 a	32,50 a	46,52 a	38,25 a
<i>B. pumilus</i> (6)	33,75 a	36,25 b	37,22 a	31,12 b
<i>B. pumilus</i> subg. B (27)	47,50 b	40,00 b	11,65 b	24,00 b
<i>B. megaterium</i> (7)	32,50 a	37,50 b	39,55 a	28,75 b
Pim 11	36,25 a	33,75 a	32,57 a	35,87 a
<i>P. macerans</i> (47)	28,75 a	26,25 a	46,52 a	50,12 a

Continua...

Tabela 7 – Continuação...

Isolados	Severidade (%)		% de controle	
	2ª Aval	3ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
<i>B. sphaericus</i> (45)	35,00 a	31,25 a	34,90 a	40,62 a
<i>B. sphaericus</i> (42)	33,75 a	37,50 b	37,22 a	28,75 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (50)	42,75 b	30,00 a	20,48 b	43,00 a
<i>P. macerans</i> subg. B (29)	41,25 b	41,25 b	23,27 b	21,62 b
<i>M. liquefaciens</i> (34)	38,75 a	37,50 b	27,92 a	28,75 b
Tom 2	32,50 a	32,50 a	39,55 a	38,25 a
<i>S. aureus</i> (18)	35,00 a	32,50 a	34,90 a	38,25 a
<i>B. sphaericus</i> (43)	33,75 a	36,25 b	37,22 a	31,12 b
Tom 23	35,75 a	44,00 b	33,50 a	16,40 b
Tom 25	37,00 a	42,50 b	31,18 a	19,25 b
Tom 24	45,00 b	30,00 a	16,30 b	43,00 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (28)	41,25 b	41,25 b	23,27 b	21,62 b
<i>B. pumilus</i> (51)	31,50 a	32,50 a	41,41 a	38,25 a
Testemunha	53,75 b	52,50 b	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 8 – Isolados bacterianos endofíticos de hastes e folhas de pimentão e tomateiro agrupados pelo diâmetro do halo de inibição (cm) à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Diâmetro do halo (cm)	Espécies e isolados de bactérias endofíticas
Grupo 1 (0,2-0,9) +	<i>Bacillus pumilus</i> (isolados 3, 20, 48 e 52) <i>Bacillus subtilis</i> (isolado 19)
Grupo 2 (1,0-1,9) ++	<i>Bacillus pumilus</i> (isolados 6, 8, 12, 39 e 51) <i>Bacillus megaterium</i> (isolado 7) <i>Bacillus pumilus</i> subgrupo B (isolados 26 e 27) <i>Acinetobacter johnsonii</i> (isolado 9)
Grupo 3 (2,0-2,9) +++	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (isolados 28 e 41) <i>Paenibacillus macerans</i> (isolado 47)
Grupo 4 (> 3,0) ++++	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (isolados 22, 32, 36, 50) <i>Paenibacillus macerans</i> (isolado 37)

CONCLUSÕES

Dentre 53 isolados de bactérias endofíticas de tomateiro e pimentão, 9 foram eficientes no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa-de-vegetação.

A espécie *Bacillus pumilus* teve o maior número de isolados eficazes na redução da pinta bacteriana do tomateiro.

Noves isolados de bactérias endofíticas obtidas de pimentão e tomate promoveram o crescimento de plantas de tomate; dentre eles, quatro isolados (*Acinetobacter johnsonii* – 10; PIM 11; *Bacillus pumilus* – 39; *B. sphaericus* – 45) também reduziram a pinta bacteriana do tomateiro em casa-de-vegetação.

A capacidade de inibição do crescimento de *Pst in vitro* foi observada em 44,2% dos isolados endofíticos,

tendo 34,8% desses isolados reduzido a severidade da pinta bacteriana do tomateiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas: método de isolamento e potencial antagonico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.
- BUREN, A. M. van; ANDRE, C.; ISHIMARU, C. A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1406, 1993.
- CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O.; BATISTA, U. G. Amplitude e efetividade de um actinomiceto pré-selecionado como agente de biocontrole de enfermidades do tomateiro, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 222-223, ago. 2002. Resumo.
- COLIN, J. E.; CHAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 11, p. 1048-1050, Nov. 1986.
- GUO, J. H.; GUO, Y. H.; ZHANG, L. X.; QI, H. Y.; FANG, Z. D. Screening for biological agents against cayenne pepper bacterial wilt. **Chinese Journal Biological Control**, Beijing, v. 17, p. 101-106, 2001.
- GUO, J. H.; QI, H. Y.; GUO, Y. H.; GE, H. L.; GONG, L. Y.; ZHANG, L. X.; SUN, P. H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 6-72, Jan. 2004.
- GUO, J. H.; WANG, Y. L.; LI, J. Screen of biocontrol bacteria of plant wilt by inhibiting zones and root-colonizing capacity. **Acta Phytopathologica Sinica**, Peking, v. 26, p. 49-54, 1996.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, A. L. R.; GARCIA, F. A. O.; MIZUBUTI, E. S. G. Seleção de bactérias de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole para três patógenos foliares. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 488, ago. 2001. Resumo.
- JONES, J. B. Bacterial speck. In: JONES, J. B.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. Minneapolis: APS, 1993. 73 p.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.
- KIMURA, O.; CARMO, M. G. F. do. Doenças causadas por bactérias em pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 66-76, 1996.
- LOPES, C. A. Manejo integrado de bactérias fitopatogênicas. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. (Eds.). **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. [S.l.: s.n.], 2001. p. 105-123.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1994. 61 p.
- MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 15-18, 1996.
- ROMEIRO, R. de S.; MACAGNAN, D. Busca, testagem, caracterização e estudo de potencialidades de uma PGPR selecionada para a cultura do tomateiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 18-43.
- ROMEIRO, R. de S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G. de; CARRIER, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopatologica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 220-224, abr./jun. 2000.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, London, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1977.
- SILVA, H. S. A.; DEUNER, C. C.; ROMEIRO, R. S. Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 281-283, jul./set. 2004a.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S. Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 295, p. 345-354, maio/jun. 2004.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; DEUNER, C. C.; CARRER FILHO, R.; GARCIA, F. A. O. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 281, ago. 2001. Resumo.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.;

MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 288-298, Feb. 2004b.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 179-183, jun. 1995.

STURTZ, A. V.; MATHESON, B. G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 184, n. 2, p. 265-271, 1996.