

THAÍS RIBEIRO SANTIAGO

SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO  
DA MURCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S235s  
2010

Santiago, Thaís Ribeiro, 1986-

Seleção de rizobactérias para o controle biológico da  
murcha bacteriana do eucalipto / Thaís Ribeiro Santiago.  
– Viçosa, MG, 2010.  
ix, 32f. : il. ; 29cm.

Orientador : Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 25-32.

1. *Ralstonia solanacearum* - Controle biológico.
2. Rizobactérias. 3. Eucalipto - Doenças e pragas.
4. Murcha-bacteriana. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.33

THAIS RIBEIRO SANTIAGO

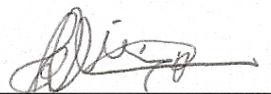
SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA  
MURCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

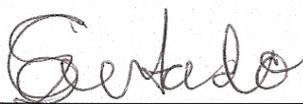
APROVADA: 22 de Julho de 2010.



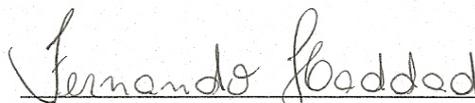
Prof. Luiz Antonio Maffia  
(Co-orientador)



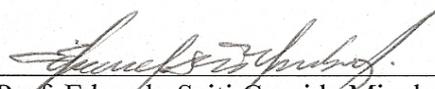
Prof. José Rogério de Oliveira  
(Co-orientador)



Prof. Gleiber Quintão Furtado



Dr. Fernando Haddad



Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Orientador)

Aos meus pais, Joaquim e Neide.

Ao Prof. Reginaldo da Silva Romeiro (*in memoriam*).

**dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai de todos.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudos de Mestrado.

Aos meus pais, pelo constante e incondicional apoio e incentivo.

A minha irmã pela paciência e companhia.

Ao Prof. Reginaldo da Silva Romeiro (IM), pela amizade, ensinamentos, paciência, por estar sempre presente e solícito a qualquer dúvida, por seu exemplo de ser humano, e principalmente por acreditar em meus sonhos. Nunca vou esquecer de você!

Ao meu orientador Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pela paciência, disposição de ajudar e pelos conselhos.

Ao meu co-orientador José Rogério de Oliveira, por estar sempre disposto a esclarecer qualquer dúvida sempre que solicitado.

Ao Doutor Carlos Alberto Lopes pela atenção dispensada e pela disposição a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas da UFV, Flávio, Hélvio, Adriana, Lívio, Bruno, Maurício, Cristhian, Elisangela e Sílvia, pela companhia e pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa.

Aos colegas do meu novo laboratório, Laboratório de Biologia de População de Fitopatógenos, Robson, Saulo, Jaime, Braz, Carine, Lahyre, Raquel, Cleysinho, Claudiney, Sarah, Leonardo e Lilian, por me acolherem tão bem e por fazer do laboratório um lugar tão prazeroso de trabalho.

Aos meus amigos que conquistei no mestrado, Cristhian, Pedro, Lidiane, Eugênio, Paulo, Douglas e Leonardo, obrigada por tudo!

A todos os professores do Departamento de fitopatologia, pelos ensinamentos prestados, com muita dedicação e presteza.

A todos os funcionários da UFV, em especial ao Bruno, laboratorista do laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas, pela sua paciência em atender a todos os estudantes.

Ao Geraldo, pelo carinho, companheirismo, amor e paciência durante todo o decorrer do curso. Como te amo!

A todas as pessoas que porventura não estejam aqui citadas nominalmente e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

**Muito Obrigada!**

## **BIOGRAFIA**

**THAÍS RIBEIRO SANTIAGO**, filha de Maria Rizoneide Ribeiro Rodriguês e Joaquim Santiago Sobrinho, nasceu em Brasiléia, Acre, em 10 de novembro de 1986.

Em março de 2004, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em janeiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 22 de Julho de 2010.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. Introdução .....	1
2. Revisão de Literatura .....	2
2.1. O patógeno .....	2
2.2. A cultura e a doença .....	3
2.3. Controle biológico por rizobactérias .....	5
3. Material e Métodos .....	6
3.1. Origem, cultivo e manutenção dos microrganismos .....	7
3.1.1. Isolados de <i>R. solanacearum</i> .....	7
3.1.2. Isolados de rizobactérias .....	7
3.2. Seleção massal .....	8
3.2.1. Mudanças oriundas de sementes microbiolizadas com o propágulo do antagonista, tendo suas raízes imersas na suspensão do patógeno (SMIR) .....	9
3.2.2. Mudanças oriundas de sementes microbiolizadas com o propágulo do antagonista colocada em solo infestado artificialmente pelo patógeno (SMSI) .....	9
3.2.3. Imersão de raízes em suspensão com propágulos do antagonista e suspensão do antagonista aplicada ao solo (IMRR) .....	9
3.3. Controle da murcha bacteriana em eucalipto .....	10
3.4. Identificação dos antagonistas promissores .....	11
3.5. Colonização de raízes .....	11
3.6. Indução de resistência .....	11
3.7. Antagonismo direto .....	12
4. Resultados .....	14
4.1. Isolamento .....	14
4.2. Seleção massal .....	14

4.3. Controle da murcha bacteriana em eucalipto .....	14
4.4. Colonização radicular.....	15
4.5. Identificação dos isolados .....	15
4.6. Indução de resistência .....	15
4.7. Ensaio em laboratório .....	16
5. Discussão .....	19
6. Conclusões .....	25
7. Referência .....	25

## RESUMO

SANTIAGO, Thaís Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Seleção de rizobactérias para o controle biológico da murcha bacteriana do eucalipto.** Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-Orientadores: José Rogério de Oliveira e Luiz Antonio Maffia.

Avaliou-se o potencial antagônico de 298 rizobactérias obtidas da rizosfera e rizoplano de tomateiro e de eucalipto contra *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana. Para a seleção de rizobactérias eficientes, realizaram-se testes em tomateiros empregando-se métodos distintos de aplicação dos antagonistas e de inoculação do patógeno: 1) plântulas oriundas de sementes microbiolizadas por embebição por 12 h em suspensão de propágulos do antagonista tiveram as raízes imersas na suspensão de propágulos do patógeno; 2) plântulas oriundas de sementes microbiolizadas por embebição por 12 h na suspensão de propágulos do antagonista foram transplantadas em solo infestado com *R. solanacearum*; e 3) imersão de raízes em suspensão com de propágulos do antagonista e posteriormente imersão em suspensão de propágulos de *R. solanacearum*. Nove isolados (UFV-11, 32, 40, 56, 62, 101, 170, 229, e 270) foram selecionados como potenciais antagonistas a *R. solanacearum*, pois suprimiram a murcha bacteriana em pelo menos um dos métodos avaliados. Os isolados selecionados foram novamente avaliados *in vitro* contra o patógeno e *in vivo* como agentes de biocontrole da murcha bacteriana em eucalipto frente a dois isolados de *R. solanacearum*. Os isolados UFV-56 e UFV-62 inibiram a murcha bacteriana em eucalipto entre 50 a 100%.

## ABSTRACT

SANTIAGO, Thaís Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Selection of rhizobacteria for biological control of bacterial wilt of Eucalyptus.** Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-Advisers: José Rogério de Oliveira and Luiz Antonio Maffia.

The antagonistic potential of 298 rhizobacteria obtained from the rhizosphere and the rhizoplane of tomato and eucalyptus plants was investigated against *Ralstonia solanacearum*. Several tests were performed using tomato plants for the selection of efficient rhizobacteria. Different methods of application of the antagonists and of inoculation of the pathogen were assessed: 1) seedlings originated from seeds that were microbiolized by soaking for 12 h in a suspension of the antagonist propagules had their roots immersed in the pathogen inoculum suspension; 2) seedlings originated from microbiolized seeds were transplanted to soil infested with *R. solanacearum*; and 3) immersion of roots in a suspension of propagules of the antagonist and later immersed in a suspension of *R. solanacearum*. Nine isolates (UFV-11, 32, 40, 56, 62, 101, 170, 229, and 270) were selected as potential antagonists to *R. solanacearum*, as they suppressed bacterial wilt in at least one of the methods assessed. The promising isolates had their antagonistic potentialities against two isolates of *R. solanacearum* tested *in vitro* and *in vivo* using inoculated eucalyptus plants. Isolates UFV-56 and UFV-62 suppressed bacterial wilt in eucalyptus by 50 to 100%.

## 1. Introdução

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é espécie arbórea da família Mirtaceae, nativa da Austrália, Timor e Indonésia (Doughty, 2000). O eucalipto tem crescimento rápido e é alternativa viável para atender a demanda de matéria-prima para a produção de celulose, madeira, carvão vegetal, óleos essenciais, etc., e seu cultivo pode contribuir para aliviar a pressão sobre as florestas nativas (Alfenas et al., 2004). No Brasil, o cultivo do eucalipto em escala econômica deu-se a partir de 1904, contudo maior expansão ocorreu a partir de 1965, com a lei dos incentivos fiscais ao reflorestamento. Atualmente, as plantações de eucalipto ocupam 4.258.704 hectares, distribuídas principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia; e o setor florestal contribui com cerca de 3,5% do produto interno bruto (Abraf, 2009).

Os projetos de reflorestamento do eucalipto no Brasil, independente da espécie plantada, caracterizam-se pelos elevados riscos técnico e econômico, a que estão sujeitos. Dentre os maiores riscos à produtividade da cultura podem-se listar as variações nas condições climáticas, o estreitamento da base genética do material cultivado, o alto índice de insolação e o estabelecimento da cultura por vários anos favorecendo a ocorrência de doenças no campo (Yabuuchi et al., 1995). Dentre as doenças da cultura do eucalipto, a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896), é uma das mais destrutivas para a cultura e pode ser fator limitante para a exploração econômica (Yabuuchi et al., 1995). A murcha bacteriana é particularmente destrutiva nas regiões tropicais e subtropicais, devido aos danos causados e seu difícil controle. Além da alta variabilidade do patógeno e ampla gama de hospedeiros, a bactéria pode sobreviver associada à rizosfera de espécies hospedeiras alternativas, cultivadas ou não, ou no solo. Além disso, *R. solanacearum* pode ser facilmente dispersa por mudas infectadas, água de irrigação e de chuva e por meio de implementos agrícolas empregados nos tratamentos culturais (Coutinho et al., 2000; Hayward, 1994; Robbs et al., 1988).

Além das características biológicas e epidemiológicas que dificultam o controle, não há produtos químicos com ação efetiva contra o patógeno e a resistência, bem como a adoção de medidas de controle cultural, não têm obtido sucesso em razão, principalmente, da grande variabilidade genética do patógeno (Javier, 1994; Lopes e Takatsu, 1997). Assim, o controle biológico é uma alternativa promissora, principalmente aquele mediado por rizobactérias. Estas espécies de bactérias compreendem um grupo de procariotas naturalmente habitantes do solo capazes de

colonizar o sistema radicular de plantas. O uso de rizobactérias é um processo econômico e compatível com as comunidades agrícolas de baixa renda, não causam impacto ambiental, nem efeito tóxico (Romeiro, 2007a). Várias bactérias antagônicas vêm demonstrando boa colonização no rizoplano e seus produtos apresentam longos tempos de prateleira e viabilidade no campo devido sua capacidade de sobreviver na rizosfera. No solo, as rizobactérias produzem aleloquímicos inibitórios e são capazes de colonizar a rizosfera da planta (Romeiro, 2007a). Isolados de *Pseudomonas fluorescens*, do tipo rizobactérias (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - PGPR), foram usados no tratamento de mudas de eucalipto, reduzindo em até 45% a incidência da murcha bacteriana (Ran et al., 2005a; Ran et al., 2005b). No Brasil ainda não se realizaram estudos utilizando rizobactérias na tentativa de controlar a murcha bacteriana do eucalipto.

Este trabalho teve como objetivos: (1) Isolar rizobactérias (actinomicetos e bactérias propriamente ditas) de rizosfera e rizoplano de tomateiro e de plantas de eucalipto nunca antes expostas a defensivos ou herbicidas, plantas estas sadias ou com baixos índices de doenças; (2) Selecionar rizobactérias quanto à efetividade para promoção de biocontrole da murcha bacteriana, usando tomateiro como sistema modelo; (3) Avaliar a eficácia de rizobactérias quanto à redução da intensidade da doença em eucalipto e estudar seus mecanismos antagônicos em ensaios laboratoriais.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. O patógeno**

*Ralstonia solanacearum* é um complexo de espécies dividido em cinco raças baseadas em suas propriedades fenotípicas. A raça 1 causa murcha em plantas da família Solanaceae; a raça 2 em bananeira; a raça 3 em batateira e tomateiro, em condições de clima temperado; a raça 4 em gengibre e a raça 5 em amoreira (Buddenhagen et al., 1962; He et al., 1983). Além das raças, há seis biovars, definidos com base no perfil metabólico de três alcoóis e três dissacarídeos (He et al., 1983). A avaliação da diversidade genética de *R. solanacearum* utilizando RFLP resultou na identificação de dois grupos, sendo o grupo 1 de estirpes asiáticas e o 2 de estirpes americanas (Cook et al., 1989; Cook e Sequeira, 1994).

Recentemente, Fegan e Prior (2005) propuseram uma nova classificação baseada nas análises de sequências dos genes de endoglucanase (*egl*) e da proteína B associada à

reação de hipersensibilidade e patogênese (hrpB). Quatro filotipos foram distinguidos. Filotipo I, corresponde ao Asiático divisão 1 de Cook et al. (1989) e contém cepas pertencentes aos biovars 3, 4 e 5. O filotipo II pertence ao americano, divisão 2 de Cook e Sequeira (1994) e contém as cepas pertencentes ao biovar 1 raça 1, biovar 1 raça 2, biovar 2 raça 3 e biovar 2T. O filotipo III contém estirpes da África que pertencem ao biovar 1 e 2T. O filotipo IV contém as cepas da Indonésia, algumas estirpes do Japão e uma única estirpe da Austrália pertencente aos biovars 1, 2 e 2T. Cada filotipo pode ser subdividido em sequevares com base em diferenças na sequência de uma parcela dos genes de endoglucanase.

O patógeno penetra na planta através de ferimentos nas raízes e pode sobreviver no solo por longos períodos (Gutarra et al., 1995). A doença é de ocorrência mais comum em locais com temperaturas mais altas e úmidas. Há relatos da transmissão do patógeno, a partir de sementes e frutos contaminados, indicando que sementes infectadas podem ser um importante meio de dispersão natural deste organismo (Sanchez Perez et al., 2008). Uma vez estabelecida no hospedeiro, a bactéria multiplica-se rapidamente nos tecidos do xilema, formando uma substância viscosa abundante. Há produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, causando desorganização do tecido vascular, podendo, indiretamente, impedir o movimento de água e nutrientes, resultando em perda de turgescência (Denny, 2000).

## **2.2. A cultura e a doença**

Os primeiros plantios de eucalipto datam do início do século XVIII, na Europa, na Ásia e na África. No século XIX, o eucalipto começou a ser plantado em países como Espanha, Índia, Brasil, Argentina e Portugal (Alfenas et al., 2004). No Brasil, foi introduzido em 1868, sendo as primeiras áreas estabelecidas no estado do Rio Grande do Sul (Alfenas et al., 2004). O país se destaca no cenário mundial por possuir excelente desempenho no setor, devido às condições climáticas e do elevado nível tecnológico empregado nos cultivos de eucalipto. A maior produtividade média da cultura é constatada no Brasil, e os principais estados produtores são Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Bahia (Abraf, 2009). As principais espécies cultivadas no Brasil são: o *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla* (Abraf, 2009). Além dessas, foram realizados cruzamentos entre as espécies que resultaram em híbridos como o urograndis (*E. grandis* X *E. urophylla*), por exemplo.

Apesar dos avanços técnicos experimentados, a produtividade das áreas plantadas ainda é afetada por diversos fatores, inclusive aqueles de ordem fitossanitária. Nesse contexto, um dos problemas que mais limitam a eucaliptocultura é a murcha bacteriana do eucalipto, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896), pois é considerada uma das doenças mais destrutivas da cultura (Sudo et al., 1983). Atualmente, sabe-se que *R. solanacearum* pode infectar mais de 200 espécies de plantas, pertencentes a 50 diferentes famílias botânicas (Hayward, 1991).

A murcha bacteriana no eucalipto é problema em diversos países e foi relatada nas principais regiões produtoras da Austrália (Akiew e Trevorrow, 1994), África do Sul (Coutinho et al., 2000), China (Wu e Liang, 1988), Taiwan (Wang, 1992) e Venezuela (Ciesla et al., 1996). Na China, mais especificamente nas províncias de Guangdong, Hainan, e Guangxi, as perdas nas plantações de eucalipto são de, em média, de 30 a 40% das plantas adultas (Li, 1992; Lin et al., 1996). Em plantas com até um ano e meio de idade as perdas foram de até 70% (Ran et al., 2005b).

No Brasil, o primeiro relato da murcha bacteriana em eucalipto foi em 1983, no município de Prata, Minas Gerais (Sudo et al., 1983). Em 1984, a doença foi observada no estado do Pará e na Bahia, ocorrendo em áreas recentemente desmatadas (Robbs et al., 1988). A murcha bacteriana causa prejuízos em viveiros clonais nos estados da Bahia, do Espírito Santo, do Maranhão, de Minas Gerais e do Pará. Além das perdas diretas, verifica-se o aumento de custos de produção, principalmente aqueles relativos às tentativas de erradicar o patógeno, à realização de adaptações das estruturas de viveiro visando minimizar os riscos com novas contaminações, além do descarte de mudas, de minicepas e de propágulos vegetativos contaminados (Mafia, 2006).

Em plantas de minijardim clonal de eucalipto, a doença tem como sintomas a necrose foliar, escurecimento parcial (anelar) ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Na fase de enraizamento, miniestacas infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão. No campo, a doença caracteriza-se por bronzeamento e necrose foliar, desfolha basal ascendente, escurecimento interno do lenho e morte da planta, geralmente, a partir do quarto mês após o transplântio. Os sintomas geralmente se agravam em árvores com enovelamento de raízes e afogamento de coleto (Alfenas et al., 2006). Não há variedade comercial resistente, o controle químico não é efetivo e a prática de rotação de cultura é inviável devido à ampla gama de hospedeiros e alta capacidade de dispersão e sobrevivência do patógeno quando no solo. Portanto, resta evitar a entrada do patógeno em áreas agricultáveis (Javier, 1994; Lopes e Takatsu, 1997). Porém, há que se buscar soluções para os casos de áreas já

infestadas e que necessitam ser manejadas. Nos últimos anos, na busca de alternativas de controle da murcha bacteriana, constatou-se haver aumento crescente das pesquisas na área de biocontrole. Tal fato também pode ser constatado para as doenças do eucalipto (Ran et al., 2005b). Segundo a definição de Baker e Cook, (1974), controle biológico é a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por um patógeno ou parasita, promovida por um ou mais organismo que não o homem, favorecidos naturalmente ou pela manipulação de seu habitat ou ambiente, hospedeiros ou antagonistas ou pela manipulação em massa de um ou mais antagonistas.

### **2.3. Controle biológico por rizobactérias**

Dentre os principais procariotas agentes de controle biológico destacam-se as rizobactérias (Romeiro, 2007a). Rizobactérias ou bactérias rizosféricas existem em grande quantidade na superfície de, e próximas a, raízes de plantas onde se nutrem de exsudatos e lisados liberados por plantas bem como fazem da rizosfera nichos ecológicos onde se abrigam e se protegem do antagonismo da microbiota circundante (Lucy et al., 2004). Muitas dessas bactérias são benéficas e são capazes de promover o crescimento e, ou, o controle biológico de doenças de plantas. As rizobactérias benéficas, intituladas PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*) promovem crescimento, controle biológico e aumentam a produtividade de culturas por vários mecanismos (Kloepper, 1996). Além disso, o uso destas é uma prática econômica, sem impacto ambiental e os produtos têm longo tempo de prateleiras, produzido facilmente em larga escala e após a aplicação no campo permanecem viáveis por muito tempo.

Dentre os agentes de biocontrole de destaque estão os actinomicetos, principalmente os pertencentes ao gênero *Streptomyces*, pelo fato de a maioria das espécies produzir antibióticos. Os actinomicetos são encontrados em muitos habitats, porém em um número muito menor comparado a outros grupos de bactérias. Vários trabalhos vêm sendo realizados explorando a capacidade de biocontrole desses organismos (Crawford et al., 1993).

A promoção do biocontrole de doenças de plantas é uma das principais características das PGPR, as quais são capazes de fazê-lo tanto por antagonismo direto como por indução de resistência (Bakker et al., 2003; Pieterse et al., 2003). Inicialmente, acreditava-se que o controle biológico promovido por rizobactérias, com características de PGPR, era devido apenas a mecanismos diretos de antagonismo

contra patógenos. Alguns mecanismos diretos estão envolvidos na supressão do controle de doenças de plantas entre eles estão: a produção de antibióticos, parasitismo, competição por nutrientes e espaço, produção de sideróforos, enzimas líticas, entre outros. Como e porque esse controle biológico é exercido, é tema que merece considerações específicas. Em algumas situações, é possível que ocorra o controle biológico clássico (Tuzun e Kloepper, 1995), todavia há casos em que apenas o antagonismo microbiano não explica o controle biológico exercido, e a indução de resistência é um possível mecanismo envolvido (Van Loon et al., 1998a). Paralela e concomitantemente, pesquisas têm mostrado que certas PGPR parecem atuar como eliciadoras de IRS (resistência sistêmica induzida), no sentido em que a planta fica sistemicamente protegida contra mais de um patógeno, ao contrário do controle biológico clássico, que implementa o controle de forma mais específica (Carrer et al., 2009).

Quando a PGPR coloniza o sistema radicular, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas e liberadas no ambiente podem atuar como eliciadores. Nesses casos, demonstrou-se o envolvimento de sinais bioquímicos, provavelmente associados a jasminatos ou etileno (Pieterse et al., 1998; Van Loon et al., 1998b). Esse sinal transloca-se até sítios distantes do local de sua gênese, isto é, genes que codificam a síntese de componentes da resistência dinâmica são ativados, assim a resistência sistêmica induzida se expressa (Sticher et al., 1997).

Ainda existe uma série de limitações ao uso de agentes comerciais de biocontrole sendo necessário o entendimento da ecologia, isso é, tanto do antagonista, como do patógeno em determinado ambiente para que o controle biológico ocorra (Van Loon, 2007).

Na China, trabalhos com rizobactérias vêm sendo conduzidos desde a década de 1960, visando à seleção de agentes de biocontrole e promotores de crescimento de plantas (Chen et al., 1996). A microbiolização de sementes, antes do plantio, com propágulos de rizobactérias, tem sido prática agrônômica rotineira na China Continental (Chen et al., 1996). Talvez pela própria filosofia de pesquisa e de enfoque de problemas, somente há algum tempo o mundo ocidental tem tomado conhecimento e percebido a incomensurável potencialidade do desenvolvimento de tecnologias específicas para o uso de rizobactérias como método de agricultura sustentável.

### **3. Material e Métodos**

### **3.1. Origem, cultivo e manutenção dos microrganismos**

#### **3.1.1. Isolados de *R. solanacearum***

Dois isolados de *R. solanacearum*, filotipo II, biovar I, codificados como RS 295 e RS 298 e pertencentes à coleção de culturas de *Ralstonia solanacearum* do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa, foram utilizados nos experimentos. Esses isolados provêm de áreas cultivadas com eucalipto das cidades de Esplanada – BA e Carbonita – MG, respectivamente.

Inicialmente, avaliou-se a patogenicidade dos isolados pela inoculação em eucalipto. A inoculação foi feita imergindo o sistema radicular de mudas do híbrido urograndis (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) com 70 dias de idade em suspensão de células bacterianas ajustada para  $OD_{540} = 0,2$  (Schaad et al., 2001b). Utilizaram-se três plantas para a inoculação de cada um dos isolados. Após 21 dias, as plantas foram avaliadas para a ocorrência de murcha. Constatado esse sintoma, segmentos do caule com exsudação bacteriana foram imersos em etanol (50%) por 30 s, e, posteriormente, em NaClO (2%) por 3 min e em seguida lavados em água esterilizada. Os fragmentos do caule com cerca de 1 cm foram depositados em gotas de água esterilizadas e macerados, sob condições assépticas. Com auxílio de uma alça de platina, realizou-se a transferência de alíquotas da suspensão para meio 523 sólido (Kado e Heskett, 1970). Após 48 h de incubação, as colônias com características típicas de *R. solanacearum*, com bordos regulares, colônias elevadas e coloração esbranquiçada, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultivo. Para confirmação da patogenicidade, mudas de eucalipto foram inoculadas com as colônias isoladas.

Para obter a suspensão de inóculo de *R. solanacearum*, os isolados foram semeados em meio 523 sólido por 72 h a  $28 \pm 1$  °C. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de água a cada placa e raspou-se a colônia para remoção das células. A suspensão de células bacterianas foi coletada em frasco tipo becker e a turbidez da suspensão foi ajustada para  $OD_{540}=0,2$ .

#### **3.1.2. Isolados de rizobactérias**

As bactérias e os actinomicetos foram isolados da rizosfera e do rizoplane de plantas sadias de eucalipto e tomate, não expostas a defensivos, oriundas dos estados de Minas Gerais e Pará. As rizobactérias foram isoladas seguindo metodologia descrita por Romeiro (2007b). Dez gramas de raiz ou solo da rizosfera de eucalipto ou de tomateiro

foram colocados em solução salina (8,5 g/100 mL de solução), sendo mantida sob agitação em Erlenmeyer por 24 h a 28 °C. Em seguida, foram feitas dez diluições seriadas de fator 10. De cada diluição, 100 µL foram retirados para semeio em placas contendo meio 523 e espalhadas com alça de Drigaskly. As placas foram mantidas em B.O.D. por 24 h a 28 °C. Colônias individualizadas de cada placa, que apresentavam coloração, tamanho e forma diferente, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio 523.

Para isolamento de actinomicetos, amostras de solos da rizosfera de tomate e eucalipto foram processadas como descrito anteriormente, incluindo tratamento térmico a 70°C, por três dias (Moura et al., 1998). Os microrganismos foram isolados a partir de diluições em série de suspensão de solo, semeando uma alíquota de 100 mL em placas de Petri, contendo meio de extrato de solo-ágar, e espalhadas com alça de Drigaskly. As placas foram mantidas por sete dias a 30°C. As colônias formadas foram transferidas para tubo contendo meio de extrato de solo-ágar.

Todos os microrganismos foram preservados em tubos contendo água de poço artesianos esterilizada. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente. Os actinomicetos foram cultivados, multiplicados e mantidos em meio de extrato de solo-ágar (Pramer e Schmidt, 1964). As suspensões salina (NaCl 0,85%) de propágulos de antagonistas foram obtidas a partir de isolados cultivados em meio 523 sólido por 48 h a  $28 \pm 1$  °C.

### **3.2. Seleção massal**

Foram usadas sementes ou plântulas de tomate cv. Santa Clara, ao invés de eucalipto, pelo fato de essa solanácea ser altamente suscetível ao patógeno e pelo desenvolvimento rápido da doença. Na seleção, utilizou-se o isolado RS 295 de *R. solanacearum*. Em todos os testes, antes da inoculação com o patógeno, as plântulas foram crescidas em casa-de-vegetação, em substrato PlantMax®, contido em vasos com capacidade de 200 mL ou em bandeja de 128 células, conforme o ensaio, e adubadas semanalmente com fertilizante foliar Ouro Verde (5g p.c./L). Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento a  $30 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 h.

Para investigação da potencialidade das rizobactérias como agente de biocontrole, cada isolado foi aplicado em três modalidades:

### **3.2.1. Mudanças oriundas de sementes microbiolizadas com o propágulo do antagonista, tendo suas raízes imersas na suspensão do patógeno (SMIR)**

Sementes foram previamente desinfestadas em etanol (50%) por 30 s, e, posteriormente, em NaClO (2%) por 3 min e em seguida lavadas em água esterilizada. Após a desinfestação das sementes, estas foram imersas em suspensão salina de propágulos dos antagonistas sem o ajuste da concentração, por 12 h, e colocadas para germinar em vasos com capacidade de 200 mL contendo solo não-esterilizado. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por 45 dias. Decorrido esse tempo, as plântulas tiveram os sistemas radiculares lavados em água corrente e imersos na suspensão de propágulos de *R. solanacearum*,  $OD_{540}=0,2$ , durante 1 min. As mudas foram plantadas em vasos de 200 mL contendo solo.

### **3.2.2. Mudanças oriundas de sementes microbiolizadas com o propágulo do antagonista colocada em solo infestado artificialmente pelo patógeno (SMSI)**

Plântulas provenientes de sementes microbiolizadas foram obtidas como descrito em 3.2.1. A cada vaso, adicionou-se 25 mL (proporção 1:8 v/v) de suspensão de propágulos de *R. solanacearum*, com  $OD_{540}=0,2$ . O solo infestado foi acondicionado em vasos com capacidade de 200 mL e mantido a  $30 \pm 2$  °C por 24 h. Após esse período, as mudas foram transplantadas para os vasos.

### **3.2.3. Imersão de raízes em suspensão com propágulos do antagonista e suspensão do antagonista aplicada ao solo (IMRR)**

Realizou-se semeadura em bandejas de 128 células contendo o substrato. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação durante 45 dias, quando foram removidas das células e tiveram o sistema radicular lavado em água corrente e posteriormente imerso na suspensão de propágulos do antagonista durante 1 min. As mudas foram transplantadas para vasos de 200 mL, em solo não-esterilizado, e 25 mL da suspensão do mesmo antagonista foi aplicado ao solo. Após sete dias, as raízes das plântulas foram novamente lavadas em água corrente, imersas na suspensão do patógeno por 1 min e as plântulas replantadas nos mesmos vasos.

Para todas as modalidades, após a inoculação, as plântulas foram observadas diariamente durante uma semana. Avaliou-se a incidência da doença e também a severidade com escala de notas que variou de 0 a 2, em que a nota 0 foi atribuída a plantas saudáveis, nota 1 para plantas parcialmente murchas (quando uma ou mais folhas

estavam murchas, mas ainda havia folhas túrgidas) e nota 2 atribuída às plantas nas quais todas as folhas estavam murchas.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 299 tratamentos (298 antagonistas e 1 testemunha). A testemunha consistiu de imersão de sementes e/ou do sistema radicular em água corrente, não esterilizada. Foram realizadas três repetições (blocos) no tempo. Cada método de avaliação foi considerado como ensaio independente, e não se realizou análise de variância. Uma unidade experimental foi constituída de uma plântula por vaso. Os dados foram submetidos à análise descritiva e, para seleção, considerou-se média das notas das três repetições, em cada modalidade, separadamente.

### **3.3. Controle da murcha bacteriana em eucalipto**

Os isolados selecionados em 3.2. foram avaliados quanto ao controle da murcha em eucalipto. Sementes do híbrido urograndis foram semeadas em bandejas de polietileno, de 128 células, contendo substrato Plantmax®, e mantidas por 70 dias em casa de vegetação com temperatura controlada ( $\pm 2$  °C). Após esse período, as plantas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remover resíduo do substrato e imersas em suspensão de propágulos de cada um dos antagonistas com  $OD_{540} = 0,2$  durante 1 min. Adicionalmente, foi dispensado 25 mL da suspensão do mesmo isolado antagonista em cada vaso. Após sete dias, as raízes das plantas foram lavadas e imersas em suspensão de propágulos dos isolados RS 295 e RS 298 de *R. solanacearum* ( $OD_{540} = 0,2$ ) por 1 min. Foram realizados ensaios separados para cada isolado do patógeno. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmaras de crescimento a  $30^{\circ} C \pm 2$ . Foram empregadas duas testemunhas: imersão de raízes em água e posteriormente inoculadas e raízes imersas em água e não inoculadas com o patógeno.

As plantas de eucalipto permaneceram por 15 dias em câmara de crescimento, a  $30^{\circ} C \pm 2$ , fotoperíodo 12 h e quantificou-se a incidência da murcha aos 7, 9, 11, 13 e 15 dias após a inoculação. Para confirmação da doença, foram tomadas amostras aleatórias de plantas murchas e realizou-se o teste de exsudação no copo (Alfenas et al., 2006).

O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizados, com 11 tratamentos (nove antagonistas e duas testemunhas). Utilizaram-se 15 e 10 plantas por tratamento nos ensaios com os isolados RS 295 e 298, respectivamente. Em ambos, a

unidade experimental foi constituída de 1 planta/vaso. Analisou-se a curva de progresso da doença para ambos os ensaios.

### **3.4. Identificação dos antagonistas promissores**

O DNA genômico dos antagonistas selecionados foi extraído conforme Schaad *et al.*, (2001a). Uma sequência parcial dos nucleotídeos do 16S rRNA foi amplificado por PCR com os primers: 27f-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG e 1488r-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TTC ACC (Schaad *et al.*, 2008). Os ciclos de amplificação foram constituídos por etapa inicial de desnaturação a 94° C por 2 min, seguida de 30 ciclos constituídos por: etapa de desnaturação a 94° C por 30 s, etapa de anelamento dos primers ao DNA molde a 50 °C por 30 s e etapa de extensão a 72 °C por 45 s. A etapa de extensão final foi a 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi sequenciado em sequenciador automático MEGABACE, no Laboratório de Genômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da UFV. As sequências foram submetidas à análise comparativa na base de dados do NCBI (BLAST - Nucleotide Sequence Database).

### **3.5. Colonização de raízes**

A capacidade de a rizobactéria colonizar o sistema radicular foi avaliada por meio da metodologia desenvolvida por Silva *et al.* (2003), que consiste em microbiolizar sementes de tomateiro. Essas sementes foram desinfestadas com imersão em etanol (50%) por 30 s, e, posteriormente, em NaClO (2%) por 3 min e em seguida lavadas em água esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram imersas na suspensão de propágulos das rizobactérias por 12 h e posteriormente postas para germinar em tubos contendo Phytigel (agente de geleificação substituto do ágar) (Sigma) a 0,05%. Cada rizobactéria foi testada em três repetições, sendo uma repetição um tubo com uma semente. Havendo colonização de raízes, é possível visualizar maior opacidade do Phytigel na região adjacente às raízes.

### **3.6. Indução de resistência**

Para determinar se a rizobactéria é potencialmente capaz de induzir resistência, utilizou-se o ensaio com cotilédones de soja descrito por Albersheim e Valent (1978), com modificações propostas por Keen *et al.* (1982) e Freitas *et al.* (2007). Quando

expostos a eliciadores, cotilédones de soja sintetizam gliceolina, uma fitoalexina com pico de absorção a 285nm. A quantificação de gliceolina permite inferir sobre a potencialidade da rizobactéria como eliciadora de resistência. Cotilédones de semente de soja, cultivar Harosoy, foram seccionados longitudinalmente, pesados e colocados (quatro seções por placa) em placas de Petri forradas com disco de papel filtro umedecido com água destilada. Sobre os cotilédones seccionados foi depositado 40 µL do sobrenadante e de lisado de cultura da rizobactéria. As placas foram mantidas em B.O.D a 28 °C e após 24 h retirados das placas e colocados em tubos contendo 10 mL de água destilada. Estes tubos foram agitados em mesa agitadora por uma hora e a solução teve sua absorbância medida a 285nm. Como controle positivo, utilizou-se o Bion (indutor de resistência).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento. Uma unidade experimental foi considerada uma placa com quatro seções de cotilédones. Inicialmente, os dados foram submetidos à análise de covariância, usando o peso dos cotilédones como covariável. Posteriormente, em função da não significância da covariável, realizou-se análise de variância utilizando o programa estatístico SAS 9.1 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC).

### **3.7. Antagonismo direto**

Realizaram-se ensaios *in vitro* para investigar o antagonismo das rizobactérias selecionadas para o controle da murcha bacteriana do eucalipto. A produção de substâncias antimicrobianas hidrossolúveis foi estudada pelos testes de dupla camada (Romeiro, 2007b). Os antagonistas foram semeados em um ponto no centro de placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo meio 523, seguindo-se incubação por 24 h a 28 °C. Decorrido este período, colônias surgidas foram expostas a vapor de clorofórmio por 1 h. Após a volatilização, as colônias foram expostas à luz UV (254 nm) por 1 h. Cada placa recebeu uma camada adicional de meio semi-sólido com propágulos do patógeno incorporado. No preparo desta camada adicional foram adicionadas células de *R. solanacearum* crescidas em meio 523 líquido por 2 dias a 28 °C. Avaliou-se a distância entre a periferia da colônia bacteriana e o limite do halo de inibição. A variável foi representada apenas pela presença ou ausência do halo de inibição.

A inibição por compostos antimicrobianos voláteis inespecíficos foi estudada pelo método das placas invertidas (Romeiro, 2007b). Aliquotas das diluições seriadas de

$10^{-1}$  a  $10^{-8}$  dos antagonistas promissores e do patógeno foram semeadas em placas de Petri com meio sólido. Procedeu-se o emparelhamento de placas de mesma diluição por 96 h a 28 °C. Após 48 e 72 h, determinou-se o número de colônias, tempo de surgimento e observou-se, diariamente, o tamanho da colônia de *R. solanacearum*. Os resultados foram comparados por meio do teste t a 5% de probabilidade.

Para averiguação de produção de sideróforos, os microrganismos promissores foram cultivados em meio King B por 48 h sob agitação (Schwyn e Neilands, 1987). Como controle, utilizaram-se as culturas, no mesmo meio, acrescido de  $\text{Fe}^{2+}$  2  $\mu\text{M}$  esterilizado por filtração a partir de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Após 48 h, o meio com crescimento bacteriano foi centrifugado e o precipitado descartado. O sobrenadante foi misturado na solução indicadora de cromo de azul S, 500  $\mu\text{L}$  de cada. A solução indicadora consiste da mistura de 600  $\mu\text{L}$  de solução de Hexadeciltrimetilamônio (HDTMA) a 10 mM e 3 mL de água destilada. Acrescentou-se, sob agitação, 150  $\mu\text{L}$  de solução férrica a partir de  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  1nM dissolvido em HCl 0,01N. Foi adicionado, também, 750  $\mu\text{L}$  de solução de cromo azul S 2 mM e 0,4307g de piperazina anidra (Schwyn e Neilands, 1987). O volume foi completado para 10 mL com água destilada. A mudança de cor da mistura de solução indicadora de azul para avermelhado, em até 15 min, indicou produção de sideróforos pelo antagonista. Toda a vidraria utilizada nesse ensaio foi imersa em solução sulfocrômica por 48 h e lavada várias vezes em água destilada.

Investigou-se, também, a produção de HCN em meio de cultura TSA semi-sólido (Trypticase Soy Ágar 40  $\text{g.L}^{-1}$ ) (Macagnan, 2005). Ao meio TSA em estado semi-fundente foram adicionados esporos de actinomicetos e células bacterianas para serem testados. Estes foram dispensados em cavidade de placas de diluição e telas de nylon foram colocadas sobre estas. Para detecção de cianeto, papel filtro foi embebido em solução de 5 mg de 4,4'- Dimetileno (-N,N-Dimetilanilina) e 5 mg de acetoacetato de etila dissolvidos em 2 mL de clorofórmio. O papel filtro foi colocado acima da tela de nylon. As placas foram colocadas em caixa do tipo Gerbox por 72 h a 28 °C. O surgimento de mancha de coloração marrom no papel indicador acusou a produção de HCN pelo antagonista.

A possibilidade de produção de amônia foi investigada semeando as bactérias antagonistas em tubos de ensaios contendo meio líquido e uma tira de papel de tornassol preso em uma das suas extremidades entre o bordo do tubo e o tampão de algodão (Schaad et al., 2001a). A mudança de cor do papel de tornassol de roxo para azulado num prazo de três dias indicou a produção de amônia pela bactéria.

## **4. Resultados**

### **4.1. Isolamento**

Isolaram-se 298 microrganismos associados às raízes e à rizosfera: 98 colônias de actinomicetos e 200 de bactérias de diferentes morfologias, elevação, cores e formas de crescimento. Estes isolados foram codificados e armazenados no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.

### **4.2. Seleção massal**

Na modalidade de aplicação por imersão do sistema radicular na suspensão do antagonista e posteriormente na do patógeno (IMRR), os isolados de rizobactérias UFV-11, 40 e 56 foram eficientes em reduzir a intensidade da murcha bacteriana (Figura 1A). Quando se empregou a imersão de semente na solução do antagonista e, posteriormente, a inoculação do patógeno diretamente no sistema radicular, sete isolados de rizobactérias, UFV-32, 56, 62, 101, 170, 229 e 270, protegeram as mudas da infecção por *R. solanacearum* (Figura 1B). No caso de sementes microbiolizadas pelo antagonista e cujas plântulas foram transplantadas em solos infestados artificialmente, 42 isolados, UFV-5, 16, 18, 31, 42, 52, 56, 66, 70, 71, 81, 84, 88, 89, 99, 112, 113, 120, 127, 135, 157, 162, 179, 180, 181, 186, 201, 206, 207, 210, 226, 240, 242, 245, 249, 253, 256, 258, 268, 276, 281 e 294, impediram o desenvolvimento da murcha (Figura 1C). Na modalidade de tratamento SMIR, para 13 isolados ocorreu a murcha em apenas uma das três plantas, enquanto nas modalidades IMRR e SMSI, a ocorrência de murcha em 1/3 das plantas foi constatada em 18 e 39 plantas, respectivamente.

Devido à maior chance de escape na modalidade SMSI foram escolhidos os agentes de biocontrole que se destacaram nas modalidades IMRR e SMIR. Assim, selecionaram-se os isolados UFV-11, 32, 40, 56, 62, 101, 170, 229 e 270. A rizobactéria UFV-56 foi a única capaz de proteger a planta nas três modalidades de tratamento quando se adotou como critério nota média igual a zero.

### **4.3. Controle da murcha bacteriana em eucalipto**

As rizobactérias UFV-56 e UFV-62 resultaram em melhor controle da murcha bacteriana do eucalipto. O isolado UFV-62 foi capaz de suprimir o patógeno em 100%

quando testado contra o isolado RS 295 de *R. solanacearum* (Figura 2A). O isolado UFV-56 reduziu a doença em 66,6% e 80%. Além disso, observou-se atraso no aparecimento da murcha em 11 e 13 dias, quando se inocularam as plantas com os isolados RS 295 e RS 298, respectivamente (Figura 2A e B). Os isolados UFV-11 e UFV-32 não foram capazes de controlar a murcha bacteriana. Os demais isolados reduziram a doença de 13,33% a 53,33% quando testados contra o isolado RS 295, e de 20 a 40% quando se utilizou o isolado RS 298 (Figura 2A e B).

Houve diferenças no controle da murcha quando os antagonistas foram testados contra isolados do patógeno de origens diferente. A maior variação do controle da doença em relação ao isolado de *R. solanacearum* ocorreu com os antagonistas UFV-62 e UFV-229. O primeiro inibiu 100% e 50% a doença quando as plantas foram inoculadas com isolado RS 295 e RS 298, respectivamente (Figura 2A e B). Enquanto o isolado UFV-229 reduziu 53,33% e 30%. Aparentemente, o isolado RS 298 é mais agressivo que o RS 295.

#### **4.4. Colonização radicular**

No bioensaio da colonização radicular *in vitro*, o isolado UFV-11 não foi capaz de colonizar as raízes das plântulas de tomate em nenhuma das três repetições. Em eucalipto, os isolados que não colonizaram as raízes foram o UFV-32 e o UFV-101. Para os demais isolados observou-se a formação de zona mais opaca, de maior densidade, nas adjacências das raízes, o que indica a colonização das raízes pelas bactérias.

#### **4.5. Identificação dos isolados**

As sequências do gene rRNA 16S revelou que o isolado UFV-40 pertence a gênero *Pseudomonas*, UFV-101 ao gênero *Stenotrophomonas*, e os isolados UFV-11, UFV-56, UFV-62, UFV-170, UFV-229 e UFV-270 ao gênero *Bacillus*. Não foi possível identificar o isolado UFV-32 devido a não especificidade do primer.

#### **4.6. Indução de resistência**

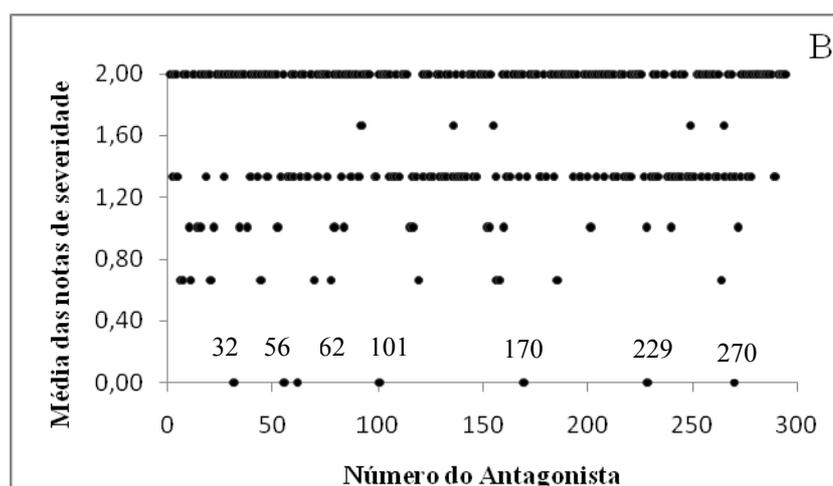
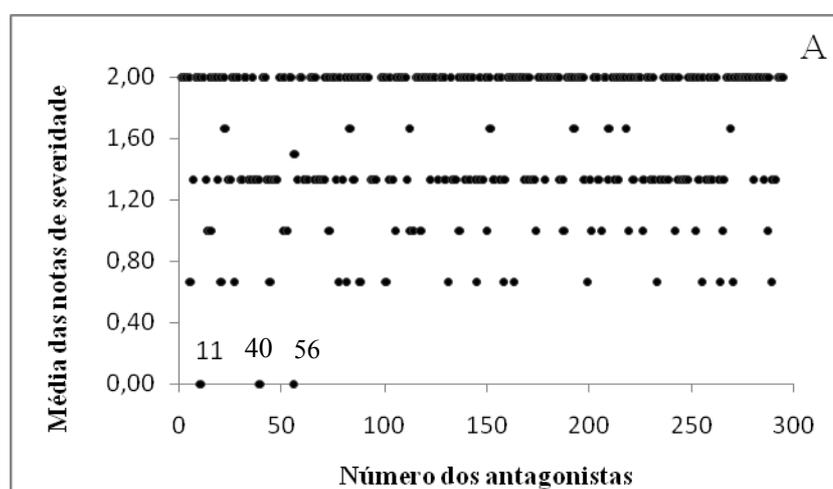
Utilizando o teste de Tukey a 5% para comparar as absorvâncias, apenas os lisados da rizobactéria UFV-56 e Bion tiveram diferenças significativas em relação aos

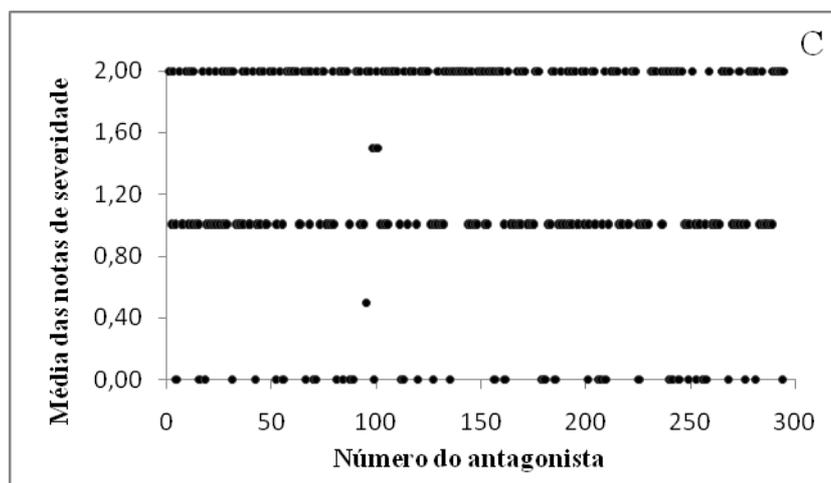
demais tratamentos, indicando a capacidade da UFV-56 em induzir resistência na planta.

#### 4.7. Ensaio em laboratório

No teste de antibiose, nenhum dos isolados promissores produziu substâncias hidrossolúveis de baixo peso molecular capazes de inibir o isolado de *R. solanacearum*. Apenas os isolados UFV- 62 e UFV-229 produziram sideróforos (Tabela 1).

Cinco isolados, UFV-11, 40, 56, 101 e 229, dos nove testados, produziram HCN.

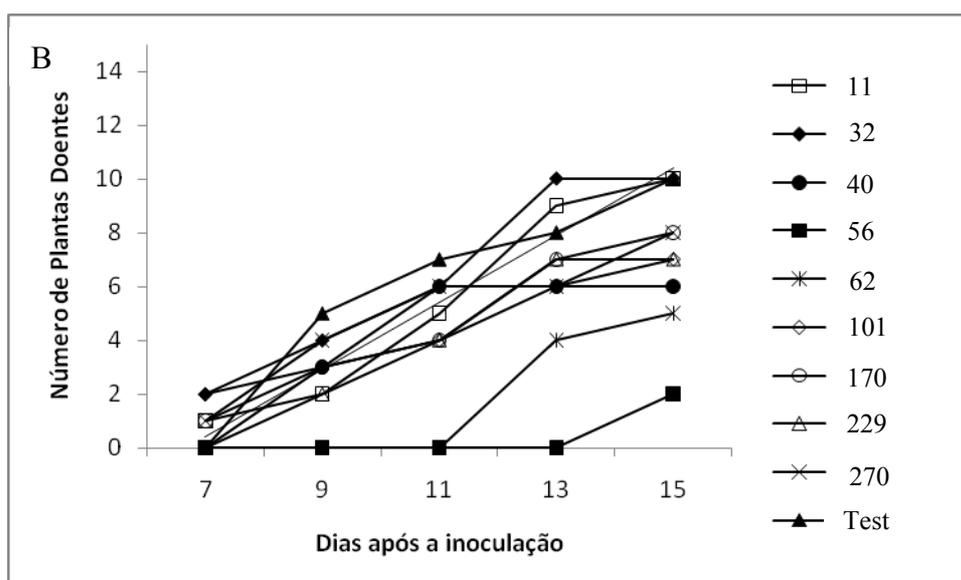
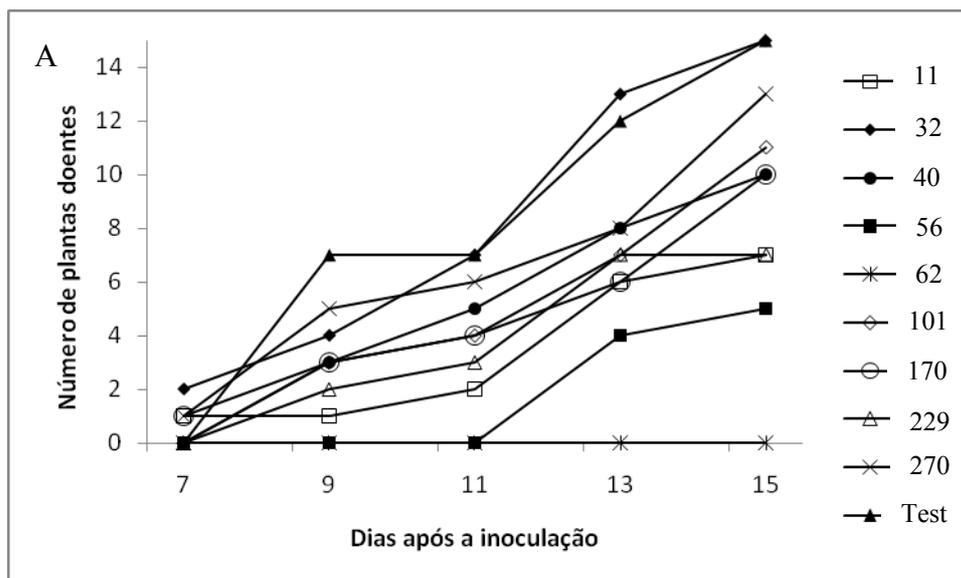




**Figura 1.** Gráfico de dispersão dos valores médios (dados de três repetições) da nota de severidade da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* em tomateiro tratados com rizobactérias em três modalidades: (A) Imersão de raízes em suspensão de rizobactérias e do patógeno (IMRR); (B) Sementes microbiolizadas e posterior imersão de raízes de plantas em suspensão de inóculo do patógeno (SMIR) e (C) Sementes microbiolizadas e plantio em solo infestado pelo patógeno (SMSI).

Não se observou diferença de intensidade das manchas formadas no papel filtro, indicativo da produção do ácido. Houve produção de amônia pelos antagonistas UFV-40, 101, 229 e 270, sendo mais evidente nos dois primeiros (Tabela 1).

Compostos voláteis sintetizados pelos antagonistas não foram capazes de diminuir o número de colônias de *R. solanacearum* nas diluições de  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  após 48 e 72 h. Porém, o isolado UFV-56 produziu algum composto volátil capaz de retardar em dois dias o crescimento de *R. solanacearum* nas diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  e diminuiu o tamanho das colônias em todas as diluições. Na diluição de  $10^{-1}$ , o isolado UFV-56 inibiu totalmente o crescimento do patógeno.



**Figura 2.** Progresso da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em plantas de eucalipto tratadas com rizobactérias. (A) Plantas inoculadas com o isolado RS 295 e (B) com o isolado RS 298. Os números à frente de cada linha referem-se ao código UFV do isolado.

**Tabela 1.** Capacidade de colonização do sistema radicular, de produção de amônia, sideróforos e ácido cianídrico (HCN) e da antibiose direta dos antagonistas selecionados como potenciais agentes de controle biológico da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em eucalipto.

Antagonistas testados	Colonização radicular		Amônia	Antibiose	Sideróforo	HCN	Voláteis	Produção de Gliceolina*
	Tomate	Eucalipto						
	UFV-11	-						
UFV-32	+	-	-	-	-	-	-	-
UFV-40	+	+	+	-	-	+	-	-
UFV-56	+	+	-	-	-	+	+	+
UFV-62	+	+	-	-	+	-	-	-
UFV-101	+	-	+	-	-	+	-	-
UFV-170	+	+	-	-	-	-	-	-
UFV-229	+	+	+	-	+	+	-	-
UFV-270	+	+	+	-	-	-	-	-

- = resultado negativo

+ = resultado positivo

\* = Capacidade de o antagonista induzir a produção de gliceolina em cotilédones de soja.

## 5. Discussão

Viabilizar o controle biológico da murcha bacteriana do eucalipto é tarefa desafiadora, pela dificuldade de se encontrar agentes promissores e por se tratar de doença altamente destrutiva. Para muitas doenças do sistema radicular, o controle biológico utilizando rizobactérias é eficiente e promissor, além de ser favorável do ponto de vista ecológico (Gamalero et al., 2003). Porém, o sucesso depende, em grande parte, de encontrar um agente de biocontrole eficaz. Duas etapas são críticas na prospecção de agentes: a metodologia de isolamento e a estratégia de seleção. No presente trabalho, o isolamento de rizobactérias realizado com as metodologias descritas anteriormente (Moura et al., 1998; Silva et al., 2004) foi eficaz. Possivelmente, por serem essas metodologias otimizadas para o isolamento de bactérias e actinomicetos, devido ao rápido crescimento de bactérias e o tratamento térmico, com alta supressividade para fungos, foi possível obter grande número, aproximadamente 300 isolados de rizobactérias.

Apesar de se preconizar que a seleção de agentes de biocontrole seja realizada na planta de interesse, no presente trabalho, a utilização de sistema-modelo baseado em tomateiro foi bem sucedida e permitiu a obtenção de agentes capazes de reduzir a intensidade da murcha bacteriana em eucalipto. Entretanto, quando se utilizam sistemas-modelo, a seleção pode não ser eficiente por haver riscos de não se considerar eventos importantes da interação planta-patógeno-antagonista. Aparentemente, a seleção em tomateiro não impediu a obtenção de agentes de biocontrole eficientes para a murcha em eucalipto. As razões para realizar bioensaios em tomateiros foram: a maior suscetibilidade desse hospedeiro à doença e o rápido progresso da murcha. Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam a eficiência da utilização de hospedeiros mais suscetíveis à determinada doença para seleção de agentes de biocontrole (Silva et al., 2000).

Dadas a natureza do desenvolvimento da murcha bacteriana e a suscetibilidade do tomateiro, considera-se que a seleção massal transcorreu sob condições que propiciaram a obtenção de agentes eficazes. Por outro lado, ao considerar o rendimento de seleção de organismos promissores (3,0% do total avaliado), esse resultado está abaixo do encontrado por Moura et al. (1998) que obtiveram 10,5 % de rizobactérias benéficas. Em outros trabalhos de seleção de agentes de controle biológico, o percentual de bactérias benéficas variou de 1 a 5% (Kloepper et al., 1980; Xue et al., 2009). Contudo, variações podem ocorrer, principalmente influenciadas pela diferença de agressividade dos patógenos usados no processo de seleção.

A modalidade de veiculação das rizobactérias afetou o desempenho e a microbiolização de sementes foi o processo mais eficiente. Segundo Buchenauer (1998), esse método é vantajoso por permitir a bactéria colonizar o sistema radicular desde a germinação da semente. O método de imersão de raízes em suspensão de antagonistas permite colonização prévia de nichos pela microbiota do solo, ocorrendo competição com o(s) agente(s) a ser(em) veiculado(s) na suspensão (Kloepper e Beauchamp, 1992). Além disso, a remoção das plantas e a lavagem do sistema radicular podem ocasionar ferimentos no sistema radicular e estes constituem porta de entrada para *R. solanacearum*. No caso das sementes microbiolizadas pelo antagonista, o fermento ocorre na inoculação do patógeno.

A seleção de maior número de antagonistas na modalidade SMSI foi, possivelmente, devido à ocorrência de escape à inoculação. Após a incorporação do patógeno ao solo, sua densidade populacional pode ter diminuído a ponto de não causar doença em algumas plantas. Infelizmente, não se monitorou a densidade populacional

ao longo do tempo, mas em outro trabalho relatou-se diminuição da densidade de *R. solanacearum* até três semanas após a incorporação ao solo (Lemessa e Zeller, 2007). Fato curioso foi a retomada gradual do aumento da população do patógeno após esse período (Lemessa e Zeller, 2007a; Lemessa e Zeller, 2007b; Vanitha et al., 2009).

No presente trabalho, as plantas submetidas à modalidade SMSI foram avaliadas 15 dias após a transferência das mudas para vasos com solo infestado, enquanto que nas outras modalidades a avaliação foi feita após uma semana. Se a avaliação ocorresse aos 30 dias após a transferência para solo infestado, espera-se maior chance de ocorrer a murcha. Portanto, os resultados desse ensaio foram usados como informação complementar para a escolha dos agentes de biocontrole.

A utilização de dois métodos de inoculação levou a seleção de antagonistas com capacidades diferentes de colonização e com mecanismos distintos de inibição do patógeno. Estudos futuros poderão ser feitos testando estes organismos em misturas e com diferentes formas de dispersão desses agentes, podendo aumentar o nível de controle da doença devido a efeitos atribuídos a sinergismo, requerimento ecológicos e o modo de ação diferente (Guetsky et al., 2001). Possivelmente, as bactérias selecionadas na modalidade SMIR reduziram a incidência da murcha por induzirem resistência na planta. As rizobactérias selecionadas na modalidade IMRR controlaram a doença provavelmente com maior envolvimento de antagonismo direto, já que tanto o patógeno como o antagonista encontravam-se no mesmo nicho ecológico. Devido à vantagem dada ao agente de biocontrole de colonizar primeiro a rizosfera, este foi capaz de colonizar as raízes da planta de tomate, e uma vez estabelecida, impediu a entrada do patógeno (Haggag e Timmusk, 2008). No biocontrole de fitopatógenos da rizosfera é extremamente importante o estabelecimento e a manutenção de populações dos antagonistas em níveis adequados. A adaptabilidade e a colonização rápida de raízes são ainda fatores importantes no estabelecimento e introdução de microrganismos na rizosfera, proporcionando uma vantagem competitiva para colonização e biocontrole (Gamalero et al., 2003; Kloepper e Beauchamp, 1992). O isolado UFV-56 apresentou alta adaptabilidade, pois há evidência de que protegeu as plantas tanto por antagonismo direto quanto induzindo a resistência da planta. Estas evidências estão embasadas nos resultados apresentados nos teste realizados *in vitro*.

Variação na média de severidade foi encontrada quando os antagonistas foram testados contra estirpes diferentes do patógeno reforçando que o uso de mais de um isolado de *R. solanacearum* é importante, uma vez que se demonstrou que a eficiência destes antagonistas pode variar com a estirpe do patógeno (Lemessa e Zeller, 2007). Os

isolados UFV-11 e 32 promoveram controle no bioensaio em tomate, mas não em eucalipto. A não repetibilidade dos resultados em eucalipto pode estar associada às peculiaridades da interação eucalipto-antagonista e/ou ineficiência em colonizar o sistema radicular devido à diferença de concentração e/ou composição das substâncias liberadas pelos hospedeiros. Além desses fatores, também vale ressaltar que as concentrações do inóculo de todas as suspensões de antagonistas foram padronizadas no bioensaio em eucalipto, o que não ocorreu em tomateiro, e o desempenho do antagonista pode estar ligado à sua concentração (Silva et al., 2000).

Concomitantemente, é possível que fatores ambientais, mais especificamente a temperatura tenha afetado a colonização do sistema radicular pelas rizobactérias. Tal efeito foi relatado em outro trabalho envolvendo a utilização de *Pasteuria penetrans* para o controle de *Meloidogyne* spp. (Hatz e Dickson, 1992; Stirling, 1981). O tratamento do sistema radicular de tomateiros com antagonistas ocorreu no mês de maio de 2010, e as temperaturas registradas foram mais elevadas que as do mês de julho, quando os isolados foram dispensados no substrato onde se cultivou eucalipto.

Até o momento, agentes de biocontrole da murcha bacteriana incluem mutantes avirulentos de *R. solanacearum* (Trigalet e Trigalet-Demery, 1990); fungos micorrízicos arbusculares (Zhu e Yao, 2004); bactérias endofíticas (Ji et al., 2008), fungos (Masunaka et al., 2009) e algumas rizobactérias antagonicas como *Pseudomonas* spp. (Lemessa e Zeller, 2007), *Bacillus* spp. (Li et al., 2008), *Streptomyces* spp. (Moura, 1996), *Stenotrophomonas* spp. (Messiha et al., 2007), *Serratia* spp. (Guo et al., 2004), *Acinetobacter* spp. e *Enterobacter* spp. (Xue et al., 2009). Nesse trabalho, encontraram-se três gêneros já relatados na literatura, como agentes promissores: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*. A grande maioria dos isolados selecionados como agentes de biocontrole pertencem ao gênero *Bacillus* que foi favorecido devido ao tratamento térmico (70 °C) realizado nas amostras para isolamento dos antagonistas, isso provavelmente ocorreu devido sua capacidade de formação de endósporo em condições adversas (Romeiro, 2007a). Para ser eficiente no biocontrole, além de sua ação antagonica, precisa também multiplicar e resistir a condições ambientais adversas. A formação de endósporo também favorece a formulação de um produto comercial, o que torna o gênero *Bacillus* bom agente de biocontrole (Raaijmakers et al., 2002). Há necessidade de uma melhor caracterização desses isolados em nível de espécie para compará-los adequadamente a isolados de outras espécies já conhecidas como agentes de biocontrole.

Dentro do limite de sensibilidade do teste de colonização radicular *in vitro*, os isolados selecionados foram capazes de colonizar o sistema radicular de tomateiro, porém nem todos foram capazes de colonizar o de eucalipto. Uma das diferenças importantes entre os hospedeiros é a quantidade e composição de exsudatos liberados pelas raízes das plantas, como açúcares e aminoácidos. Essa diferença pode afetar a colonização radicular, o tamanho da população e a atividade dessas rizobactérias (Buchenauer, 1998). Acredita-se que por esse motivo tenha havido diferenças na capacidade de colonização e também variações no controle da doença, uma vez que as rizobactérias UFV- 32 e UFV- 101 não impediram completamente o desenvolvimento da murcha bacteriana em eucalipto, durante todo o período de avaliação. Porém, referente à não supressão da epidemia, é necessário salientar que as avaliações em tomateiro foram realizadas apenas aos sete dias após a inoculação. Novos ensaios deverão ser conduzidos, com maior número de plantas e de unidades experimentais para melhor compreensão do efeito epidemiológico do uso das rizobactérias, principalmente o atraso do início da epidemia.

Os mecanismos de ação de rizobactérias ainda não foram totalmente elucidados, mas acredita-se que haja envolvimento de indução de resistência, competição, liberação de compostos antimicrobianos como sideróforos, antibióticos, enzimas e outras moléculas que podem suprimir a população do patógeno (Romeiro, 2007a). Os testes *in vitro* com as bactérias promissoras auxiliaram o entendimento dos mecanismos de ação desses antagonistas. Contudo, Aliye et al. (2008) afirmam que existe relação entre testes em laboratório e casa de vegetação. Por outro lado, Ran et al. (2005b) não encontraram tal relação. Vale ressaltar que apesar de a maioria dos resultados apresentarem correlação entre testes *in vitro* e *in vivo*, testes adicionais são necessários para se concluir com mais segurança acerca do controle biológico da murcha bacteriana no presente trabalho.

Dentre os nove antagonistas que se destacaram no bioensaio, o isolado UFV-11 foi o único que não colonizou o sistema radicular de tomateiro, porém foi capaz de controlar a doença nesta planta. Isso ocorreu, possivelmente, pela sua incapacidade de aderir à semente e/ou de não colonizar o sistema radicular devido à composição dos exsudatos, dado que houve colonização do sistema radicular de eucalipto. Xue et al. (2009) observaram que raízes nuas imersas na suspensão do antagonista tiveram menor colonização por rizobactérias em relação às oriundas de sementes microbiolizadas. Contudo, Gotz et al. (2006) constataram que *Pseudomonas putida* (PRD16) e *Enterobacter cowanii* (PRF116) colonizaram mais eficientemente as raízes nuas do que

quando inoculadas na semente. É possível que UFV-11 tenha colonizado o sistema radicular de tomateiro com menor intensidade quando veiculado por meio da microbiolização de sementes e/ou apresentou maior eficiência de colonização quando em contato com raízes nuas. A menor ou não colonização do sistema radicular de tomateiro, dentro de certos limites, era esperada, dado que este isolado apresentou ser ótimo antagonista na modalidade IMRR, mas não obteve o mesmo desempenho nas modalidades SMSI e SMIR.

Deve ser dada atenção aos isolados UFV-56 e 62, ambos com alto potencial para proteger tomateiro e eucalipto contra *R. solanacearum*. O isolado UFV-56 controlou a murcha bacteriana do tomateiro quando o antagonista foi aplicado nas duas modalidades, comprovando ser bom agente de biocontrole. Porém, além de sobreviver e multiplicar na rizosfera e rizoplano precisa ser competitivo e adaptado para sobreviver em ambientes onde existam outros microrganismos (Lugtenberg et al., 2001). O isolado pode induzir resistência na planta e, em altas concentrações, produzir substâncias voláteis que inibiram o crescimento e multiplicação de *R. solanacearum*. Entretanto, até o momento, não se conhece a natureza dessa(s) substância(s). Sabe-se que esse isolado não é capaz de produzir amônia. Possivelmente, a produção de HCN está envolvida na inibição de crescimento. O ácido cianídrico é um potente inibidor de enzimas envolvido na respiração de microrganismos e é sintetizado por algumas bactérias (Ramette et al., 2003). A produção de HCN não parece ser a única variável responsável pelo controle da doença, pois outras bactérias selecionadas (UFV-11, 40, 101 e 229) produziram ácido cianídrico, mas não controlaram a doença com mesma eficiência registrada para UFV-56. Postula-se que a eficiência do controle ocorreu pela redução das atividades do patógeno na rizosfera e pela ativação dos sistemas de defesa intrínsecos da planta.

Um mecanismo usado pelo isolado UFV-62 que possivelmente está envolvido no controle da murcha bacteriana é sua capacidade de produzir sideróforos. As bactérias que produzem sideróforos são capazes de sequestrar  $Fe^{+++}$  tornando este micronutriente indisponível para o patógeno. Muitos agentes de biocontrole possuem esse mecanismo antagônico (Macagnan, 2005; Ran et al., 2005a). Porém não houve correlação entre produção de sideróforos *in vitro* por *Pseudomonas putida* WCS358r, *P. fluorescens* WCS374r e WCS417r e *P. aeruginosa* 7NSK2 no controle da murcha bacteriana do eucalipto (Ran, Li et al., 2005). Apesar de não caracterizados adequadamente, os sideróforos produzidos pelo isolado UFV-72 podem ser do tipo catecolato ou hidroxamato. É provável que várias substâncias além das estudadas no presente trabalho sejam responsáveis pelo controle da murcha bacteriana do tomateiro e do eucalipto.

Face aos resultados promissores obtidos no presente trabalho, faz-se necessária análise mais detalhada dos compostos químicos envolvidos.

Sabe-se que testes em casa de vegetação, para se revestirem de confiabilidade no que tange à reprodutibilidade, precisam ser repetidos no tempo e com um número maior de repetições por tratamento. É possível que pequenas variações na temperatura, hospedeiro, concentração do inóculo e a agressividade do patógeno contribuam para a reversão da expectativa da confirmação da eficiência dos agentes promissores. Numa próxima etapa, outros estudos deverão ser conduzidos, principalmente com vistas a conhecer: outros mecanismos de antagonismos envolvendo os isolados UFV-56 e UFV-62; o desempenho desses isolados em campo; a capacidade de sobrevivência em diferentes tipos de solo e clima; e a possibilidade de uso conjunto dos isolados promissores para maximizar o controle.

## 6. Conclusões

- As rizobactérias UFV 56 e UFV 62 reduziram a incidência da murcha bacteriana do eucalipto;
- A estratégia de selecionar um antagonista utilizando tomateiro como sistema-modelo para controlar a murcha bacteriana do eucalipto foi eficiente;
- Os isolados promissores apresentam mecanismos de ação diferentes para controlar *R. solanacearum*;
- Os isolados UFV-56 e UFV-62 foram promissores agentes de controle biológico da murcha bacteriana do eucalipto.

## 7. Referência

Associação Brasileira de Florestas Plantadas – ABRAF, 2009. Anuário estatístico ABRAF - ano base 2008, Brasília.

Akiew, E., Trevorrow, P.R., 1994. Management of bacterial wilt of tobacco, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingfort, UK, pp. 178-198.

- Albersheim, P., Valent, B.S., 1978. Host-pathogen interactions in plants - plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol.* 78, 627-643.
- Alfenas, A.C. et al., 2006. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatol. Bras.* 31, 357-366.
- Alfenas, A.C. et al., 2004. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Imprensa Universitária - UFV, Viçosa.
- Aliye, N. et al., 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biol. Control* 47, 282-288.
- Baker, K.F., Cook, J., 1974. Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathology Society, San Francisco.
- Bakker, P.A.H.M. et al., 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 25, 5-9.
- Buchenauer, H., 1998. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *J. Plant Dis. Prot.* 105, 329-348.
- Buddenhagen, I.W. et al., 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Carrer, R. et al., 2009. Potenciality of an actinomycete from tomato rhizosphere as a biocontrol agent for tomato diseases. *Hortic. Bras.* 27, 340-344.
- Chen, Y. et al., 1996. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture, in: Utkhede, R.S., Gupta, V.K. (Eds.), Management of Soil Born Disease. Kalyani Publishers, Ludhiana, pp. 165-184.
- Ciesla, W.M. et al., 1996. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, 17, *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI, Rome, Italy.
- Cook, D. et al., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2, 113-121.
- Cook, D., Sequeira, L., 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingford, United Kingdom, pp. 77-94.

- Coutinho, T.A. et al., 2000. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *For. Pathol.* 30, 205-210.
- Crawford, D.L. et al., 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 3899-3905.
- Denny, T.P., 2000. *Ralstonia solanacearum* - a plant pathogen in touch with its host. *Trends Microbiol.* 8, 486-489.
- Doughty, R.W., 2000. The eucalyptus: a natural and commercial history of the Gum tree. *For. Sci.*
- Fegan, M., Prior, P., 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex", in: Allen, C., Prior, P. (Eds.), *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. APS Press, Madison, WI, pp. 449-462.
- Freitas, M.A. et al., 2007. Um método simples para detectar a potencialidade de microrganismos e produtos químicos para a indução de resistência em plantas a patógenos. XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, *Fitopatol. Bras.* 32, 167-168.
- Gamalero, E. et al., 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie* 23, 407-418.
- Gotz, M. et al., 2006. Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 207-218.
- Guetsky, R. et al., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biocontrol control. *Phytopathology* 91, 621-627.
- Guo, J.H. et al., 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29, 66-72.
- Gutarra, E.R.F.L. et al., 1995. Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops, in Hardy, B., French, E.R. (Eds.), *Integrated Management of Bacterial Wilt. Proceedings of an International Workshop held in New Delhi, New Delhi, India*, p. 195.
- Haggag, W.M., Timmusk, S., 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 104, 961-969.
- Hatz, B., Dickson, D.W., 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *J. Nematol.* 24, 512-521.

- Hayward, A.C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas-Solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 65-87.
- Hayward, A.C., 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), *Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingford, UK, pp. 25-34.
- He, L.Y. et al., 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67, 1357-1361.
- Javier, E.Q., Foreword, in Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingford, UK, pp. XI.
- Ji, L.X. et al., 2008. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 565-573.
- Kado, C.I., Heskett, M.G., 1970. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. *Phytopathology* 60, 969-973.
- Keen, N.T., Romeiro, R.S., 1982. Produção de gliceolina por cotilédones de soja expostos a eliciadores obtidos de diferentes isolados de fitobactérias. XV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, *Fitopatol. Bras.* 559.
- Kloepper, J.W., 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions - biological control agents vary in specificity for hosts, pathogen control, ecological habitat, and environmental conditions. *Bioscience* 46, 406-409.
- Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J., 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant-roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38, 1219-1232.
- Kloepper, J.W. et al., 1980. Enhanced plant-growth by siderophores produced by plant growth-promoting Rhizobacteria. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 180, 147-BIOL.
- Lemessa, F., Zeller, W., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biol. Control* 42, 336-344.
- Li, S.M. et al., 2008. Analysis of defence enzymes induced by antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* strain AR12 towards *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Ann. Microbiol.* 58, 573-578.
- Li, W.D., 1992. The occurrence and control of eucalypt bacterial wilt in Hainan province. *Hainan Forestry Science and Technology* 3, 21-22.
- Lin, X.P. et al., 1996. The epidemic law of bacterial wilt in *Eucalyptus*. *Journal of Central South Forestry University.* 16, 49-55.

- Lopes, C.A., Takatsu, A., 1997. Controle da murcha bacteriana. *Fitopatol. Bras.* 22, 224-225.
- Lucy, M. et al., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 1-25.
- Lugtenberg, B.J.J. et al., 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39, 461-470.
- Luo, K., Wang, Z., 1983. Control of bacterial wilt with antagonistic *Pseudomonas spp.* and avirulent *P. solanacearum*. *Acta Phytopathologica Sinica* 13.
- Macagnan, D., 2005. Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora spp.*) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso*. Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 113.
- Mafia, R.G., 2006. Sintomatologia, Etiologia e Controle da Murcha Bacteriana do Eucalipto. Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 96.
- Masunaka, A. et al., 2009. Visualization of *Ralstonia solanacearum* cells during biocontrol of bacterial wilt disease in tomato with *Pythium oligandrum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 281-287.
- McCormack, R.B., 1937. Algumas observações sobre as moléstias das plantas em Pernambuco. *Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco* 2, 90-104.
- Messiha, N.A.S. et al., 2007. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *Eur. J. Plant Pathol.* 118, 211-225.
- Moura, A.B., 1996. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomate. Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, pp. 167.
- Moura, A.B. et al., 1998. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 33.
- Paulitz, T.C., Belanger, R.R., 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 103-133.
- Pieterse, C.M.J. et al., 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 35, 39-54.

- Pieterse, C.M.J. et al., 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1571-1580.
- Pramer, D., Schmidt, E.L., 1964. Experimental Soil Microbiology. Burgess Publishing Company, Saint Paul.
- Raaijmakers, J.M. et al., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537-547.
- Ramette, A. et al., 2003. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 525-535.
- Ran, L.X. et al., 2005a. Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* 113, 59-70.
- Ran, L.X. et al., 2005b. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biol. Control* 32, 111-120.
- Robbs, C.F. et al., 1988. Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos, in: Técnico, C. (Ed.), EMBRAPA, Jaguariúna, SP, p. 4.
- Romeiro, R.S., 2007a. Controle biológico de enfermidades de plantas - fundamentos. Editora UFV, Viçosa, MG.
- Romeiro, R.S., 2007b. Controle biológico de enfermidades de plantas - procedimentos. Editora UFV, Viçosa, MG.
- Sanchez Perez, A. et al., 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol.* 220-231.
- Schaad, N.W. et al., 2001a. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, third ed. American Phytopathological Society, Minnesota.
- Schaad, N.W. et al., 2001b. Plant pathogenic bacteria, third ed. APS, Saint Paul.
- Schaad, N.W. et al., 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 434-446.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47-56.

- Silva, H.S.A. et al., 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol. Control* 29, 288-295.
- Silva, H.S.A. et al., 2000. Actinomycetes as biocontrol agents for rose crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Summa Phytopathol.* 26, 459-463.
- Silva, H.S.A. et al., 2003. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. *J. Phytopathol.* 151, 42-46.
- Sticher, L. et al., 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
- Stirling, G.R., 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica* 27, 458-462.
- Sudo, S. et al., 1983. Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e bracatinga (*Mimosa scabrella Penth*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. *Fitopatol. Bras.* 8, 631.
- Trigalet, A., Trigalet-Demery, D., 1990. Use of avirulent mutants of *Pseudomonas-Solanacearum* for the biological-control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 27-38.
- Tuzun, S., Kloepper, J.W., 1995. Potential applications of plant growth-promoting Rhizobacteria to induced systemic disease resistance, in: Reuveni, R.E. (Ed.), *Novel Approaches to Integrated Pest Management*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 115-127.
- Van Loon, L.C., 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 243-254.
- Van Loon, L.C. et al., 1998a. Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens* 21, 103-110.
- Van Loon, L.C. et al., 1998b. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36, 453-483.
- Vanitha, S.C. et al., 2009. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol.* 54, 685-695.
- Wang, W.Y., 1992. Survey of Eucalyptus diseases in Taiwan. *Bull. Taiwan Forestry Res. Inst.* 7, 179-194.

- Wu, Q.P., Liang, Z.C., 1988. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Journal South China Agriculture University* 9, 59-67.
- Xue, Q.Y. et al., 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biol. Control* 48, 252-258.
- Yabuuchi, E. et al., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis, 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39, 897-904.
- Zhu, H.H., Yao, Q., 2004. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *J. Phytopathol.* 152, 537-542.