



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

***Pseudomonas* fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas no
controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**

JOSEFA NEIANE GOULART BATISTA

Brasília - DF

2015

JOSEFA NEIANE GOULART BATISTA

***Pseudomonas* fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas no controle de
Ralstonia solanacearum em tomateiro**

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia pelo Programa
de Pós Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Carlos Hidemi Uesugi, Dr.

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Batista, G. N. J.

***Pseudomonas* fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.**

Josefa Neiane Goulart Batista.

Brasília, 2015

Número de páginas p.: 49.

Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília, Brasília.

Murcha Bacteriana, controle biológico, *Pseudomonas*, tomate.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Título. ***Pseudomonas* fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.**

Dedico a minha filha Júlia, ao meu pai Josvaldo, a minha mãe Nelma, a minha irmã

Josiane e minha sobrinha Giovanna.

Agradecimentos

A Deus. Aos meus pais Josvaldo e Nelma.

A minha filha Júlia, minha irmã Josiane e minha sobrinha Giovanna.

Ao meu orientador Professor Carlos Hidemi Uesugi.

Aos colegas do mestrado e doutorado Elenice, João Gilberto, Pedro Victor, Ricardo,

Cleia, Maurício, Rafaela, Maria Geane, Karina, Carina.

Aos funcionários do departamento de fitopatologia José Ribamar, José Cezar, Arlindo,

Arenildo, Maria e Mariza Sanchez (*in memoriam*).

Aos professores: Juvenil Cares, Cléber Furlanetto, Helson Mário, Adalberto Café, Rita de Cássia Pereira Carvalho, Renato Resende, Alice Nagata, Robert Miller, José Carmine

Dianese e Luíz Eduardo Blum.

Aos funcionários da Estação Experimental de Biologia, Fábio Fonseca, Evandro

Calixto, Aldo Mostardi, Francisco e Olinda.

Ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Carlos Hidemi Uesugi**. Apoio Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

***Pseudomonas* fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.**

JOSEFA NEIANE GOULART BATISTA

DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/____por:

Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
(Examinador Interno)

Dr. Reinaldo José de Miranda Filho
(Examinador Externo)

Dr. Carlos Hidemi Uesugi
(Orientador Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL

2015

Sumário

Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
2. Objetivo Geral.....	3
2.1 Objetivos específicos.....	3
3. Revisão bibliográfica	4
3.1 A cultura do tomateiro.....	4
3.2 Murcha bacteriana do tomateiro	6
3.3 Controle biológico	12
3.4 <i>Pseudomonas</i>	16
4. Material e Métodos	18
4.1 Localização da área e a coleta do material	18
4.2 Locais dos ensaios	19
4.3 Isolamento, purificação e manutenção de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	19
4.4 Testes <i>in vitro</i> – Prospecção da antibiose por difusão em dupla camada.....	21
4.5 Seleção dos isolados	22
4.6 Testes <i>in vivo</i> : Efeito dos isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> no tomateiro.....	22
5. Resultados.....	24
5.1 Isolamento de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	24
5.2 Testes <i>in vitro</i> – Prospecção da antibiose por difusão em dupla camada.....	24
5.3 Testes <i>in vivo</i> : Efeito dos isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> no tomateiro.....	26
6. Discussão	33
7. Conclusões	39
8. Referências bibliográficas.....	40

Índice de Figuras

Figura 1. Etapas do teste <i>in vitro</i> , de antibiose por difusão em dupla camada, para seleção de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes antagonistas a <i>Ralstonia solanacearum</i> , segundo Romeiro (2007, com modificações) citado por Marques (2012).....	22
Figura 2. Isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes sob luz ultravioleta.	24
Figura 3. Teste de antibiose <i>in vitro</i> pelo método de difusão em dupla camada contra <i>Ralstonia solanacearum</i> isolado UnB 1173, halos de inibição formados pelos isolados JCP 8.1 e JCP 8.5.....	25
Figura 4. Relação entre plantas com e sem sintoma de Murcha Bacteriana, no experimento com a estirpe de <i>R. solanacearum</i> UnB 1173. Plantas tratadas com isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	28
Figura 5. Relação entre plantas com e sem sintoma de Murcha Bacteriana, no experimento com a mistura das estirpes UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173 de <i>R. solanacearum</i> . Plantas tratadas com isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.	29
Figura 6. A-Sintoma de murcha em tomate. B- teste do copo feito em planta com sintoma de murcha.	33

Índice de Tabelas

Tabela 1. Hospedeiras e local de ocorrência de <i>Ralstonia solanacearum</i> de acordo com raças e biovares (Buddenhagen <i>et al.</i> , 1962; Hayward, 1991).....	8
Tabela 2. Classificação para <i>Ralstonia solanacearum</i> baseado no genótipo (Fegan & Prior, 2005).....	9
Tabela 3. Nome popular, nome científico, número de amostras coletadas e número de isolados obtidos das espécies vegetais de onde foram obtidos os isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	19
Tabela 4. Isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes, nome científico das espécies de onde foram coletados e local de origem dos isolados.	20
Tabela 5. Inibição de <i>Ralstonia solanacearum</i> por isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes provenientes de diferentes solanáceas.....	25
Tabela 6. Efeitos dos isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes no controle da Murcha Bacteriana causada por <i>R. solanacearum</i> UnB 1173.	27
Tabela 7. Efeitos dos isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes no controle da Murcha Bacteriana causada pela mistura das estirpes UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173 de <i>R. solanacearum</i>	28
Tabela 8. Análise estatística do efeito dos isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes no controle de <i>R. solanacearum</i> estirpe UnB 1173 e o halo de inibição produzido <i>in vitro</i>	30
Tabela 9. Análise estatística do efeito dos isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes no controle da mistura de três estirpes (UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173) de <i>R. solanacearum</i> e o halo de inibição produzido <i>in vitro</i>	30
Tabela 10. Relação entre o diâmetro médio dos halos de inibição produzido por <i>Pseudomonas</i> fluorescentes e o controle de Murcha Bacteriana do tomateiro causada por <i>Ralstonia solanacearum</i>	31

Resumo

Batista, Josefa Neiane Goulart. *Pseudomonas fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas no controle de Ralstonia solanacearum em tomateiro*. 2015. Número de páginas (49p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A Murcha Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) é uma das mais importantes doenças do tomateiro em regiões tropicais. Seu controle é difícil, a principal medida é evitar a entrada da bactéria no local de plantio, principalmente em cultivo protegido. O objetivo deste trabalho foi encontrar isolados de *Pseudomonas* fluorescentes provenientes da rizosfera de solanáceas do cerrado, para uso no controle biológico de *R. solanacearum*. Foram realizadas coletas de solo da rizosfera de diversas plantas da família Solanaceae, de onde foram obtidos 40 isolados de *Pseudomonas* spp. Esses isolados foram submetidos a teste *in vitro* pela metodologia de prospecção de antibiose pelo teste de dupla camada, onde verificou se que 33 isolados conseguiram inibir o crescimento de *R. solanacearum*. Os isolados que induziram os maiores diâmetros do halo de inibição, 12 (F 1.5, PEDRA, F 1.2, F 4.1, JOMG 1.1, JBR, T3, RJ 1.1, JOBA, PSD 9, JAL, JCP 8.1) e foram selecionados para os ensaios em casa de vegetação. Os ensaios em casa de vegetação foram divididos em dois, um com uma estirpe de *R. solanacearum* (UnB 1173), outro com a mistura de três estirpes do patógeno (UnB, 1033, 1103 e 1173). Cinco isolados (RJ 1.1, F 4.1, JCP 1.1, PEDRA e JOBA) controlaram a doença no ensaio com uma estirpe do patógeno. Oito isolados (RJ 1.1, F 1.2, F 1.5, F 4.1, JCP 8.1, PSD 9, JOBA e JAL) controlaram a doença com a mistura de três estirpes do patógeno. Os isolados RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA conseguiram controlar a doença nos dois ensaios, demonstrando assim potencial para uso no controle biológico da murcha bacteriana.

Palavras-chave: Murcha Bacteriana, *Pseudomonas*, tomateiro, controle biológico.

Orientador: Carlos Hidemi Uesugi – UnB

Abstract

Batista, Josefa Neiane Goulart. 2015. **Fluorescent *Pseudomonas* from the rhizosphere of the cerrado Solanaceae for the control of *Ralstonia solanacearum* in tomato.** Number of pages (49p). Dissertation (Master in Plant Pathology - Universidade de Brasilia (UnB), Brasilia, DF, Brazil

The bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) is one of the most important tomato diseases in tropical regions. His control is difficult, the key measure is to prevent bacteria from entering the local planting, especially in protected cultivation. The objective of this study was to find fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of the cerrado nightshade, for use in the biological control of *R. solanacearum*. Soil samples were collected from the rhizosphere of various plants of the Solanaceae family, from which they were obtained 40 isolates of *Pseudomonas* spp. These isolates were subjected to *in vitro* test methodology for prospecting antibiosis the double layer pattern, which found that 33 isolates were able to inhibit the growth of *R. solanacearum*. Isolates that induced the larger diameters of inhibition zone, 12 (F 1.5, STONE, F 1.2, F 4.1, JOMG 1.1, JBR, T3, RJ 1.1 JOBA, PSD 9, JAL, JCP 8.1) and were selected for the trials in the greenhouse. The tests in the greenhouse were divided into two, one with a strain of *R. solanacearum* (UNB 1173), another with a mixture of three strains of the pathogen (UNB, 1033, 1103 and 1173). Five isolates (RJ 1.1, F 4.1, JCP 1.1, PEDRA and JOBA) controlled the disease in the test with a strain of the pathogen. Eight isolates (RJ 1.1, F 1.2, F 1.5, F 4.1, JCP 8.1, PSD 9, JOBA and JAL) controlled the disease with the mixture of three strains of the pathogen. Isolated RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA managed to control the disease in two trials, demonstrating potential for use in biological control of bacterial wilt.

Keywords: bacterial wilt, *Pseudomonas*, tomato, biological control.

Advisor: Carlos Hidemi Uesugi – UnB

1. Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das olerícolas mais consumidas no mundo, cultivada em todas as regiões do Brasil (Lopes *et al.*, 2005). Pertence à Família Solanaceae, é uma planta herbácea que apresenta dois hábitos de crescimento: indeterminado, para cultivo tutorado e produção de frutos de mesa; determinado, para cultivo rasteiro com finalidade agroindustrial (Filgueira, 2000). O Brasil é o oitavo produtor mundial de tomate, o 3º em produtividade, com uma produção em torno de quatro milhões de toneladas (FAO, 2014). As regiões que mais produzem tomate são Sudeste e Centro-Oeste, com destaques para SP, MG e GO com as maiores produção do fruto em toneladas, no ano de 2012 (IBGE, 2013).

A produção de tomate é muito susceptível à doenças, vários patógenos tem como hospedeira esta planta, existem mais de 30 doenças (micoses, bacterioses, viroses e nematoses) na cultura do tomateiro (Lopes *et al.*, 2005). Dentre essas, a Murcha Bacteriana [*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.*, 1995] que chega ser um fator limitante no verão chuvoso nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e na maior parte do ano nas regiões Norte e Nordeste (Lopes *et al.*, 2005). *Ralstonia solanacearum* é gram-negativa, aeróbica, células em forma de bastonete que são moveis com 1-4 flagelos polares, (Kado, 2010). Tem como sintomas, a murcha das folhas na parte superior da planta devido à colonização do xilema e a deposição de polissacarídeos neste, escurecimento dos vasos na base do caule e exsudação de um pus bacteriano quando se faz o teste do copo (Lopes & Reis, 2011). A Murcha Bacteriana é uma doença de difícil controle, a principal medida é evitar a entrada da bactéria no local de plantio, principalmente em cultivo protegido (Lopes & Reis, 2011), visto que não existem plantas de tomate com alta resistência a este patógeno (Lopes *et al.*, 2005). Essa dificuldade no controle da doença é devido às características de ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética e capacidade de sobreviver no solo por muitos anos, apresentadas pela bactéria (Hayward, 1991).

Com este cenário, o uso de métodos alternativos de controle se faz necessário para o manejo desta doença. Dentre os tipos de controle: químico, cultural, genético e biológico. O controle biológico surge como uma alternativa para o controle das doenças de plantas, visto que há uma demanda por uma agricultura mais sustentável. Controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (Cook & Baker, 1983). Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa no hospedeiro (Bettioli, 1991).

Dentre os microrganismos antagonistas, encontram-se as rizobactérias. Esses antagonistas são bactérias de solo que colonizam raízes e promovem o aumento no crescimento das plantas. Dentre essas rizobactérias se encontra a bactéria *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas fluorescens* são bactérias gram-negativas e em meio de cultura King's B produz pigmentos fluorescentes visto em luz ultravioleta (Kado, 2010). Existem diversos trabalhos testando essas bactérias no controle de diferentes patógenos, principalmente os de solo e existem diferentes produtos comerciais com estas bactérias (Bettioli *et al.*, 2012).

Assim, diante da importância que a Murcha Bacteriana representa para a cultura do tomateiro no Brasil, o objetivo deste trabalho é a obtenção de *Pseudomonas fluorescens*, principalmente de solanáceas do cerrado, que consigam controlar a Murcha Bacteriana do tomateiro.

2. Objetivo Geral

- Encontrar isolados de *Pseudomonas* fluorescentes que consigam controlar a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em tomateiro

2.1 Objetivos específicos

- Encontrar isolados de *Pseudomonas* fluorescentes na rizosfera de plantas da família Solanaceae provenientes do cerrado;
- Verificar *in vitro* a eficiência dos isolados de *Pseudomonas* em impedir o crescimento de *Ralstonia solanacearum*;
- Em condição de casa de vegetação, confrontar os isolados que obtiveram melhor resultado em teste *in vitro* contra *R. solanacearum* e conseguir controlar ou evitar o aparecimento da doença em tomateiro.

3. Revisão bibliográfica

3.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro comum (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta originária da região dos Andes, desde o Equador, passando pela Colômbia, Peru, Bolívia, até o norte do Chile, pertencente à família Solanaceae (Alvarenga, 2004). A cultura desta olerícola é mais disseminada em todo mundo (Filgueira, 2003).

Dentre os grandes produtores mundiais de tomate se destacam China, Estados Unidos, Índia, Turquia e Egito, respectivamente (FAO, 2014), o Brasil ocupa a oitava colocação no ranking mundial com uma produção superior a quatro milhões de toneladas, sendo os estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Bahia, os maiores produtores brasileiros, respectivamente, (IBGE, 2014). No Brasil esta cultura é a segunda hortaliça em importância econômica, sendo superada apenas pela batata. Esse aumento da demanda pelo fruto foi impulsionado pela grande variedade de produtos industriais derivados e das vantagens nutricionais.

O tomateiro é uma planta de porte arbustivo, sendo cultivada anualmente; podendo desenvolver-se de forma rasteira, semi-ereta ou ereta. As plantas se desenvolvem bem em amplo espectro de latitude, tipos de solos, temperaturas e métodos de cultivo, sendo o ambiente quente e com boa iluminação e drenagem os mais adequados para o seu cultivo (Alvarenga, 2004). Apresenta dois hábitos de crescimento distintos, sendo que estes hábitos interferem no manejo e na ocorrência de pragas e doenças. O tomate com hábito indeterminado é aquele conduzido de forma tutorada, produzindo frutos para a mesa. O de hábito determinado produz frutos com finalidade agroindustrial, sendo a cultura rasteira (Filgueira, 2003). Cerca de 70% da produção nacional de tomate é destinada ao mercado fresco, em saladas, e o restante é para o processamento na agroindústria (Peixoto, 2003).

A produção de tomate para o consumo *in natura* no Brasil sofreu grandes transformações tecnológicas, nesta última década. Dentre elas, a utilização de sementes híbridas de cultivares que produzem frutos do tipo longa vida foi sem dúvida uma das mais importantes. O fruto do tomate das cultivares tradicionais possui uma vida bem curta após a colheita; enquanto os de longa vida possui uma vida pós-colheita mais prolongada, permanecendo firmes por um maior período de tempo (Alvarenga, 2004). Nos últimos 30 anos, novas cultivares e híbridos de tomate foram lançados, como o tomate do segmento Santa Cruz, caracterizado por frutos firmes e arredondados e bem vermelhos. Já o tipo italiano é alongado, tem sabor mais adocicado e é adequado para fazer molhos. O tomate-caqui tem polpa grossa com sabor um pouco ácido. E os híbridos comerciais do tipo longa vida, de formato do tipo salada, e cultivares rasteiras, algumas vezes usadas também para consumo *in natura* (Embrapa, 2014).

A cultura do tomateiro está sujeita a vários problemas fitossanitários, que podem ser causados por fungos, vírus, nematoides e bactérias. Dentre os fungos, os que causam tombamento de mudas (*Rhizoctonia solani*), podridões radiculares e de colo (*Sclerotium rolfsii*), murchas vasculares (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Verticillium* spp.), manchas foliares (*Alternaria* spp., *Stemphylium* spp.) e podridões de frutos (Ex.: *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp.; *Corynespora cassicola*); Requeima (*Phytophthora infestans*). As viroses, geminivirose (*Tomato severe rugose virus*), Vira-Cabeça (tospovirus como, *Tomato spotted wil virus*), Mosaico (potyvirus, como o *Potato Y virus* e *Pepper yellow mosaic virus*) e crinivírus (*Tomato chlorosis virus*). Entre os nematoides, o principal nematoide causador de danos expressivos no tomateiro é o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.). Várias bacterioses ocorrem no Brasil e entre elas se destacam: Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*); Murcha Bacteriana (*Ralstonia solanacearum*); Pinta Bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*); Mancha Bacteriana (*Xanthomonas* spp.);

Podridão Mole e Talo-Oco (*Pectobacterium* spp.) e Podridão-da-Medula (*Pseudomonas corrugata*) (Malavolta Jr *et al.*, 2007). As fitobactérias são fator limitante à exploração econômica da cultura do tomateiro, dentre essas, a Murcha Bacteriana se destaca como a principal fitobacteriose (Lopes & Ávila, 2005).

3.2 Murcha Bacteriana do tomateiro

A Murcha Bacteriana é uma das principais doenças da cultura do tomate e de muitas outras solanáceas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Hayward, 1991). No Brasil, ela chega a ser um fator limitante na produção de tomate nas regiões norte e nordeste, além de acarretar perdas significativas no centro-sul do país durante as épocas mais quentes do ano (Silveira *et al.*, 1996). É uma das fitobacteriose mais importantes no mundo, afetando mais de 50 famílias botânicas. Entre as principais hospedeiras, se encontram as espécies da família Solanaceae (Hayward, 1994).

Esta bacteriose foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1896, por Erwin F. Smith, afetando batata, tomate e berinjela (Hayward, 1994). No Brasil, a murcha bacteriana foi relatada por Von Parseval, em 1922, em fumo e batata, no estado do Rio Grande do Sul (Takatsu & Lopes, 1997).

A Murcha Bacteriana é uma doença causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1886) (Yabuuchi *et al.*, 1995). A nomenclatura de *R. solanacearum* tem sofrido algumas mudanças desde a primeira descrição feita por Smith em 1896, quando foi denominada *Bacillus solanacearum* Smith. Em 1914 passou a *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, e em 1992 Yabuuchi *et al.*, propuseram um novo gênero, *Burkholderia*, para o qual transferiram sete espécies do gênero *Pseudomonas*, entre elas *P. solanacearum*, que passou a ser denominada de *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, (Yabuuchi *et al.*, 1992). Finalmente em 1995, com base na análise molecular da sequência do gene da região 16s do rRNA e análises quimiotaxonômicas, passou a ser designada de *R.*

solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.* (Yabuuchi *et al.*, 1995). É considerada como uma espécie heterogênea ou um complexo de espécies, devido a grande variabilidade em relação a gama de hospedeiras, distribuição geográfica, virulência, transmissibilidade por insetos, propriedades fisiológicas e adaptação a diferentes temperaturas (Fergan & Prior, 2005).

Ralstonia solanacearum é uma bactéria bastonetiforme aeróbica, habitante do solo, gram-negativa, pertencente à subdivisão β das proteobactérias. Seu genoma é composto de dois replicons circulares constituídos de um cromossomo de 3,7 megabases e um megaplasmídeo de 2,1 megabases, característica conservada em grande número de isolados analisados (Genin & Boucher, 2004). Isolados virulentos são essencialmente não flagelados e não móveis, enquanto os isolados avirulentos tem alta motilidade sendo providos de 1 a 4 flagelos. Tem metabolismo oxidativo, considerado geralmente como aeróbio estrito, no entanto cresce limitadamente quando as células não estão em contato direto com o ar. A bactéria acumula poli- β -hidroxi-butirato como reserva de carbono. Embora não produza pigmento fluorescente, produz pigmento marrom em meio de cultura sólido contendo tirosina. Cresce em temperatura entre 25 a 35°C; nenhum crescimento é observado a 4 ou 40°C (Mehan *et al.*, 1994).

Quanto à morfologia, Kelman (1954) observou diferentes tipos de colônias: um normal, cujas colônias são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas; um mutante de colônias redondas, translúcidas, rugosas e não fluidas. Observou ainda que em meio contendo tetrazólio, as colônias normais virulentas são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas, branca ou levemente avermelhadas no centro da colônia e as mutantes avirulentas completamente vermelhas.

Ralstonia solanacearum é classificada filogeneticamente da seguinte maneira: domínio Bactéria, filo Proteobactéria, classe β -proteobactéria, ordem Burkholderiales, família

Burkholeriaceae, gênero *Ralstonia*, espécie *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1986) Yabuuchi *et al.*, 1995.

A taxonomia bacteriana em geral vem sofrendo mudanças contínuas e até radicais em consequência da incorporação sistemática de métodos de caracterização molecular dos ácidos nucleicos para a classificação (Takatsu & Lopes, 1997).

Por isso, *R. solanacearum* que é uma bactéria cosmopolita, extremamente variável, adaptada a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais diversas condições edafoclimáticas (Takastu & Lopes, 1997), tem alta diversidade de fenótipos e genótipos, sendo necessária a utilização de sistemas e classificação a nível infra-específico, em raças de acordo com sua capacidade de infectar diferentes hospedeiros (Buddenhagen *et al.*, 1962). Também os isolados foram separados em biovares, baseado na capacidade de utilizar açúcares e alcoóis (maltose, lactose, celobiose, manitol, dulcitol, e sorbitol) como fonte de carbono (Hayward, 1991). Atualmente, são conhecido cinco biovares para *R. solanacearum* (tabela1).

Tabela 1. Hospedeiras e local de ocorrência de *Ralstonia solanacearum* de acordo com raças e biovares (Buddenhagen *et al.*, 1962; Hayward, 1991).

Raça	Hospedeira	Ocorrência	Biovar
1	Muitas espécies, mais de 50 famílias.	Ásia, Austrália, Américas	1, 3 e 4
2	Banana e outras espécies de musa	Brasil, Caribe, Filipinas	1
3	Batata.	Geral, exceto EUA e Canadá	2
4	Gengibre	Ásia	3 e 4
5	Amora	China	5

Embora as classificações em raças e biovars tenham sido úteis nos últimos anos, tem a inconveniência de não serem consistentes, uma vez que se baseiam em características fenotípicas (Silveira *et al.*, 2005). Então, Fegan & Prior (2005), em seus estudos desenvolveram um método de classificação novo onde o principal fator de discriminação dos isolados é o genótipo. Nessa nova proposta o termo filotipo, que é identificado por PCR multiplex baseado na região ITS do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S é usado para designar grupos maiores no nível de subespécies. O termo sequevar, que é identificado pela análise de sequência de genes de endoglucanases, é usado para designar grupos infra-subespecíficos (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação para *Ralstonia solanacearum* baseado no genótipo (Fegan & Prior, 2005).

Nível taxonômico	Equivalência taxonômica	Nomenclatura	Modo de identificação
Espécie	Espécie	Complexo <i>R. solanacearum</i>	PCR Primers
Filotipo	Subespécie	Filotipo I, II, III e IV	PCR multiplex baseada na região ITS
Sequevar	Grupos infra-subespecíficos	Sequevar 1-23	Sequenciamento do gene de endoglucanase
Clone	Linhagens clonais		Métodos de fingerprinting (RAPD, AFLP, PFGE)

Ralstonia solanacearum é capaz de penetrar o hospedeiro por qualquer ferimento, sendo a penetração pela raiz a mais importante. Após a penetração, a bactéria coloniza os espaços intercelulares do córtex radicular em menos de 4 horas e após 2 a 3 dias coloniza inteiramente esses espaços e os vasos do xilema (Liu *et al.*, 2005; Saile *et al.*, 1997). Uma vez

nos vasos do xilema, a bactéria se multiplica, espalhando-se rapidamente para as partes aéreas da planta pelo sistema vascular, atingindo densidade de células superior a 10^9 UFC/g de haste (Tans-Kersten *et al.*, 2004). As células bacterianas produzem exopolissacarídeos de alta viscosidade, considerado o principal fator de virulência, que obstrui parcial ou totalmente o xilema, impedindo que a água atinja a parte aérea da planta. A planta também reage à colonização do patógeno formando tiloses, dificultando ainda mais a passagem de água, causando a murcha (Gonzalez & Allen, 2003). Além disso, observa-se um desequilíbrio hormonal de auxinas e etileno, reduzindo o hormônio de crescimento e formando raízes adventícias (Buddenhagen & Kelman, 1964). O mecanismo de ataque inicial das raízes e o quimiotactismo ainda não foram bem esclarecidos, porém evidências sugerem que o mesmo esteja relacionado com os *pili* e o papel de alguns lipopolissacarídeos (Romantschuk, 1992).

O principal sintoma da doença é o aparecimento da murcha, inicialmente nas folhas superiores, ocorre dentro de poucos dias nas plantas infectadas em condições favoráveis à doença (Akiew & Trevorrow, 1994). A epinastia dos pecíolos e o desenvolvimento de raízes adventícias e o escurecimento do xilema são sintomas comuns em tomateiro (Lopes & Quezado-Soares, 1997).

A presença de exsudação é uma maneira fácil e rápida de diagnosticar corretamente a Murcha Bacteriana. O teste do copo consiste em cortar-se uma pequena porção da parte mais inferior do caule da planta doente, colocando-a ligeiramente submersa em frasco transparente com água limpa. A presença de um filete leitoso saindo do tecido em direção ao fundo do copo indica a presença da Murcha Bacteriana. A complementação do diagnóstico é feita no laboratório (Lopes, 2009).

Uma vez presente na área, a Murcha Bacteriana é favorecida por alta temperatura e alta umidade do solo. A disseminação a curta distância ocorre pela movimentação de solo, maquinário agrícola e utilização de ferramentas contaminadas nas práticas culturais,

introduzindo a doenças em novas áreas. Neste processo, a capacidade de sobrevivência da bactéria no solo, água e restos culturais, a presença de infecções latentes, bem como hospedeiros alternativos e plantas invasoras tem influência fundamental (Coutinho, 2005). A disseminação a longa distância ocorre principalmente pelo transporte de material vegetal infectado (Takatsu & Lopes, 1997).

O controle da Murcha Bacteriana é bastante dificultado, pois *R. solanacearum* pode sobreviver saprofiticamente por longos períodos em diferentes tipos de solos (Denny, 2005). A capacidade de sobrevivência pode ser explicada pela capacidade do patógeno de utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fonte de energia ou ainda pela habilidade de entrar em uma fase dormente (Grey & Steck, 2001).

Por essa capacidade de sobrevivência no solo, ao grande círculo de hospedeiras e a alta variabilidade genética da bactéria, o controle da doença é difícil (Lopes & Quezado-Soares, 2000). Recomendam-se medidas que evitem ou impeçam o surgimento da doença tais como: plantio em áreas novas e distantes dos locais de cultivos anteriores, uso de material propagativo sadio adquirido em locais idôneos e certificados, cuidados com a água de irrigação prevenindo a disseminação do patógeno, controle de nematoides, cuidados nos tratamentos culturais. Quando o patógeno está instalado na área de cultivo recomenda-se, em geral, essas medidas: rotação de culturas, de preferência com gramíneas, tomando o cuidado de eliminar as plantas daninhas suscetíveis; solarização por dois a três meses; utilização de porta-enxertos resistentes; seleção de material de plantio livre do patógeno; uso de material resistente seria o mais viável, mas atualmente não existem cultivares de tomate com nível adequado de resistência à doença, por causa da grande variabilidade e complexidade da espécie e sua interação com fatores ambientais (Lopes & Quezado-Duval, 2005). O uso de microrganismos antagonistas surge como uma alternativa ao controle da Murcha Bacteriana (Michel *et al.*, 1996).

3.3 Controle biológico

A crescente preocupação da sociedade com a contaminação do ambiente por pesticidas, o aumento da demanda por alimentos mais saudáveis, sem o uso de agrotóxicos. Os agrotóxicos têm efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, as águas, os animais e o homem. Diante disso, o controle biológico surge como uma alternativa viável para o controle de doenças de plantas, considerada uma alternativa vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo e à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (Bettiol, 2001).

Controle biológico é definido por Baker & Cook (1974) como a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes de doença por um patógeno ou parasita, promovida por um ou mais organismos que não o homem, favorecidos naturalmente ou pela manipulação do seu habitat ou ambiente, hospedeiros ou antagonistas ou pela manipulação em massa de um ou mais antagonistas. Segundo Bettiol (1991), a doença na planta é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno, e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção, apresentando potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para este autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo em um sistema biológico.

O controle biológico visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle biológico é de fundamental importância para aumentar as vantagens competitivas no ambiente (Bettiol, 1991).

Segundo Agrios (2005), os mecanismos pelos quais microrganismos antagonistas afetam a população de patógenos não são sempre claros, mas são geralmente atribuídos ao

parasitismo direto, competição por nutrientes e nichos ecológicos e produção de substâncias antibióticas.

Os microrganismos antagonísticos são considerados ideais para o biocontrole quando possuem uma ou mais destas características: boa capacidade de colonização e competitividade no ambiente do patógeno; requerimento nutricionais semelhantes aos patógenos alvo; adaptação ao meio ambiente do patógeno; resistência a fatores ambientais como temperatura, dessecação, radiação, químicos; fácil cultivo e multiplicação, aplicação e formulação; não ser patogênico ao homem ou animais; não ser fitopatogênico virulento; capacidade de atuar em diferentes plantas hospedeiras e amplo espectro de ação, contra diferentes patógenos; compatibilidade com agrotóxicos para uso em controle integrado e com outros antagonistas para uso em misturas; sobrevivência, persistência e capacidade de redistribuição; baixa frequência de mutações (Bettiol, 1991).

Para a seleção destes antagonistas são realizados diversos testes *in vitro* e *in vivo*. Os métodos *in vitro*, além de serem práticos, servem como uma seleção preliminar para avaliar a capacidade antagonista, e também indicam o comportamento do microrganismo, com relação à sua capacidade de adaptação, crescimento e reprodução *in vitro*. Os principais métodos de seleção de microrganismos *in vitro* descritos são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta, camada dupla, líquido metabólico, entre outros (Mariano, 1993).

Diversos fungos e bactérias têm sido estudados com objetivo de serem utilizados no biocontrole de doenças de plantas. Dentre esses, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicilium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Bettiol, 2009). As bactérias representam um importante grupo de microrganismos antagonistas para o biocontrole, em especial, para as doenças radiculares, podendo ser classificadas em bactérias endofíticas e epifíticas. (Mariano *et al.*, 2005)

As bactérias que ficam em grande quantidade na superfície de, e próximas a raízes de plantas onde se nutrem de exsudatos e lisados liberados por plantas são chamadas de

rizobactérias ou bactérias rizosféricas (Lucy *et al.*, 2004). Antoun & Kloepper (2001) define rizobactérias, como bactérias que conseguem se multiplicar e colonizar as raízes das plantas em todos os estágios de crescimento da planta, na presença de uma microflora concorrente. Geralmente, as interações entre as plantas e os microrganismos podem ser classificadas como patogênica, saprófita e benéfica (Lynch, 1990). Muitas dessas bactérias são benéficas e são capazes de promover o crescimento e, ou, o controle biológico de doenças de plantas. As rizobactérias benéficas são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, PGPR, (plant growth-promoting rhizobacteria). O termo de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal foi utilizado pela primeira vez em 1978 com a utilização de estirpes específicas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* (Kloepper, 1978). Na China, as PGPR são conhecidas e comercializadas como bactérias que aumentam a produtividade e em 1987 já eram aplicadas em larga escala, em 48 diferentes culturas (Kloepper, 1997). No Brasil, os primeiros trabalhos foram realizados na década de 80 com o objetivo de promover o crescimento de tomateiro e cafeeiro em condições de casa de vegetação (Mariano *et al.*, 2004). Atualmente, diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo trabalham com rizobactérias visando o controle de doenças e promoção do crescimento de plantas.

As PGPR atuam como agente de biocontrole através da produção de ácido cianídrico, β -1,3-glucanase, quitinases, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe^{+3} e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (Mariano *et al.*, 2004).

A antibiose é uma interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito nocivo sobre o outro, inibindo a germinação e crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (Bettioli, 1991; Silveira, 2001).

Na antibiose, são produzidos compostos bactericidas, fungicidas ou micostáticos e nematicida. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas

concentrações, são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros organismos (Fravel, 1988).

Competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação por alimento, espaço e oxigênio (Bettioli, 1991). A competição por espaço se dá pela ocupação de sítios de colonização e a competição por nutrientes, pelos três elementos essenciais para a maioria dos patógenos: carbono, nitrogênio e ferro (Paulitz, 1990). As bactérias do gênero *Pseudomonas* são os principais organismos que apresentam a competição pelo Fe^{+3} , realizada por sideróforos (Brunetta, 2008).

Proteção cruzada é a infecção de uma célula por um patógeno, reduzindo a possibilidade da infecção por outro patógeno relacionado, ou seja, o patógeno não infecta o hospedeiro porque os sítios de infecção estão ocupados pelo isolado protetor (Cook & Baker, 1983).

Parasitismo é a interação entre dois organismos, onde um parasita o outro. Numa relação de parasitismo, o parasita normalmente deriva seus requerimentos nutricionais do hospedeiro. Essa relação é caracterizada por um longo período de contato, que pode ser físico ou metabólico (Melo, 1996).

Indução de resistência sistêmica é o aumento da capacidade de defesa da planta contra diversos patógenos após a estimulação apropriada, tornando-a mais resistente. A indução de resistência sistêmica está diretamente ligada a alterações bioquímicas e estruturais na planta (Soterro, 2003). Quando uma rizobactéria coloniza a raiz, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizada atuam como eliciadores de sinais bioquímicos. Esses eliciadores agem como sinais e acionam genes codificadores de compostos de defesa, havendo, assim, a indução de resistência sistêmica (Van Loon *et al.*, 1998).

As principais PGPR são *Pseudomonas* spp., espécies de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*; *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia*, entre outras (Mariano *et al.*, 2005).

3.4 *Pseudomonas*

Segundo Hernández (2000) as bactérias do gênero *Pseudomonas* predominam entre todos os microrganismos que habitam a rizosfera, por serem capazes de colonizar os órgãos das plantas, tais como, raízes e tubérculos, utilizam exsudatos radiculares e produzem uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos a fungos e bactérias fitopatogênicas, entre os quais se destacam os antibióticos e os alcaloides. Além da antibiose, certas espécies de *Pseudomonas* são capazes de produzir compostos que quelam o ferro (sideróforos), presente em baixas concentrações na rizosfera (Romeiro, 2007). Muitas espécies de *Pseudomonas* podem ser utilizadas na conservação do meio ambiente e na biorremediação de solos contaminados pois possuem a habilidade de degradar compostos xenobióticos (Bundy *et al.*, 2004).

Além disso, tem grande capacidade de colonizar as raízes das plantas e podem melhorar o crescimento dessas, por sua capacidade de suprimir fitopatógenos em torno das raízes por três mecanismos ecológicos diferentes, promovendo o crescimento e nutrição da planta, o antagonismo contra fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos, e indiretamente com indução de resistência (Jacobsen *et al.*, 2004).

As *Pseudomonas* spp. são bactérias gram-negativas, aeróbias obrigatórias, formato do tipo bacilo, móvel por meio de múltiplos flagelos polares e produzem um pigmento verde-amarelo fluorescente (pioverdina) em meio B de King (King; Ward; Raney, 1954), observado sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta, tem exigências nutricionais simples e crescem bem em qualquer meio com uma fonte de carbono e nitrogênio (Palleroni, 1984). Tem como temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30 °C, embora tenham detectado o seu crescimento a 4 °C (Prescott *et al.*, 1999). São capazes de produzir

exopolissacarídeos que são usados para a proteção contra bacteriófagos ou desidratação (Brimer & Montie, 1998).

As espécies mais importantes desse grupo são *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, geralmente estudadas com o objetivo de se avaliar a ação das mesmas na promoção de crescimento e biocontrole (Bettiol, 1991).

P. fluorescens tem no seu genoma um cromossomo circular com 7,1 Mbp e um teor de GC de 63,3%. Tem ainda 87 RNAs e 6137 proteínas, 5,7% do seu genoma contribui para o metabolismo secundário. A produção de metabólitos secundários desempenha um papel importante na supressão de doenças de plantas (Paulsen *et al.*, 2005).

Recentemente, abordagens bioquímicas e moleculares tem proporcionado uma nova visão sobre a interação genética entre os agentes de biocontrole, fitopatógenos e plantas. Em seus estudos Paulsen *et al.*, (2005), identificou várias características que contribuem para a associação entre a bactéria e a rizosfera das plantas colonizadas por esta, a capacidade de utilizar os exsudatos liberados pelas raízes, uma diversidade de sideróforos, um sistema de desintoxicação para se proteger do estresse oxidativo e das toxinas encontradas em patógenos de solo e a falta de sistema de secreção do tipo III.

P. fluorescens é classificada filogeneticamente da seguinte maneira: domínio Bactéria, filo Proteobactéria, classe γ -proteobactéria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, gênero *Pseudomonas* Migula (1894).

O potencial de *P. fluorescens* na indução de resistência a doenças e na promoção de crescimento de plantas tem sido estudado em diversas culturas, como crescimento bacteriano de algodão (Rajendran *et al.*, 2006), queima bacteriana das folhas do arroz (Chitrashree *et al.*, 2011), murcha de *Fusarium* do tomateiro (Ramamoorthy *et al.*, 2002), *Botrytis cinerea* em morango (Haggag *et al.*, 2012) e podridão radicular causada por *Pythium* em tomate e pimenta (Ramamoorthy *et al.*, 2002).

Vários resultados têm sido obtidos para a utilização de *Pseudomonas* spp. no biocontrole de diversas doenças. O isolado PP22 de *P. putida* inibiu o crescimento de um largo espectro de bactérias fitopatogênicas em meio de cultura (Lião, 1989). Hartman *et al.*, (1993) em seus estudos conseguiu inibir o crescimento de *R. solanacearum* em meio de cultura utilizando isolados de *P. cepacia*, *P. fluorescens* e *P. gladioli*, esses mesmos isolados resultaram em uma redução de 65% da doença em tomateiros em condição de casa de vegetação. Zhou *et al.* (2014) demonstrou a eficácia de isolados de *P. fluorescens* contra *R. solanacearum* tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além da capacidade de promover o crescimento do tomateiro após a inoculação da mesma. Nos seus estudos, Abo-Elyousr *et al.* (2012), obteve resultados positivos utilizando *P. fluorescens* no biocontrole de *R. solanacearum*, conseguiu reduzir em 58% a severidade da doença e o modo de inoculação mais eficiente foi a inoculação no solo.

4. Material e Métodos

4.1 Localização da área e a coleta do material

As amostras de solo foram coletadas em novembro de 2013 e entre os meses de fevereiro a abril de 2014, em diversos pontos do cerrado mineiro, goiano e baiano. A maior parte do material coletado procede de solos de solanáceas do cerrado (tabela 3) e outra parte de plantas cultivadas. As amostras de solo foram retiradas na faixa de 10 a 20 cm do solo proveniente das raízes destas, acondicionadas em sacos plásticos, e mantidas em câmara fria a 4 °C até a etapa do isolamento.

Tabela 3. Nome popular, nome científico, número de amostras coletadas e número de isolados obtidos das espécies vegetais de onde foram obtidos os isolados de *Pseudomonas* fluorescentes.

Nome popular	Nome científico	Nº de amostras coletadas	Nº de isolados obtidos
Joá	<i>Solanum asperolantum</i>	3	4
Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>	5	16
Camapu	<i>Physalis angulata L.</i>	3	1
Joá-de-capote	<i>Nicandra physaloides L. (Pers)</i>	2	2
Fumo	<i>Nicotiana tabacum L.</i>	1	5
Tomate	<i>Solanum lycopersicum L.</i>	1	1
Joá-vermelho	<i>Solanum capsicoides</i>	1	0
Melância	<i>Solanum aculeatissimum</i>	1	0
Lobeira	<i>Solanum lycocarpum</i>	4	0
Maria-preta	<i>Solanum americanum</i>	1	0

4.2 Locais dos ensaios

Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (UnB), localizado em Brasília, Distrito Federal.

Estação Experimental de Biologia (EEB) da UnB, Distrito Federal.

4.3 Isolamento, purificação e manutenção de *Pseudomonas* fluorescentes.

Foram preparados frascos com 100 mL de água esterilizada, um frasco para cada amostra, em cada frasco foi colocado 1 g do solo correspondente, depois agitada a suspensão de onde foi retirado 20 µL e plaqueado em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) sólido e incubado por 24 h a 28 °C, cada amostra foi feita em triplicata, depois as placas de Petri foram observadas sob luz ultravioleta, as colônias que tiveram fluorescência foram selecionadas e transferidas para outras placas de Petri contendo meio 523 semi-sólido, foram feitas várias repicagem até a obtenção de isolados puros, 40 isolados foram selecionados (tabela 4). Para preservação em médio prazo, os isolados foram mantidos em tubos com

tampas de roscas, com 10 mL de água destilada estéril à temperatura ambiente. Em cada amostra de solo foram determinados diferentes isolados bacterianos.

Tabela 4. Isolados de *Pseudomonas* fluorescentes, nome científico das espécies de onde foram coletados e local de origem dos isolados.

Isolados	Nome científico das espécies	Local de origem
CABA 3.1	<i>Physalis angulata</i> L.	Mansidão-BA
CADF	<i>Nicandra physaloides</i> L. (Pers)	Ceilândia-DF
CADF1	<i>Nicandra physaloides</i> L. (Pers)	Ceilândia-DF
F 1.2	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Águas Lindas de Goiás-GO
F 1.5	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Águas Lindas de Goiás-GO
F 2.2	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Águas Lindas de Goiás-GO
F 4.1	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Águas Lindas de Goiás-GO
F 5.2	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Águas Lindas de Goiás-GO
JAL	<i>Solanum paniculatum</i>	Águas Lindas de Goiás-GO
JBR	<i>Solanum paniculatum</i>	Brazlândia-DF
JCP 1	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 1.1	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 2	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 4.1	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 4B	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 7	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 8.1	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 8.2	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 8.3	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 8.4	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 8.5	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 821	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JCP 841	<i>Solanum paniculatum</i>	Floresta Nacional de Brasília-DF
JOBA	<i>Solanum asperolantum</i>	Mansidão-BA
JOMG 1.1	<i>Solanum asperolantum</i>	Unai-MG
JOMG 1.2	<i>Solanum asperolantum</i>	Unai-MG
JOMG 3.2	<i>Solanum asperolantum</i>	Unai-MG

PEDRA	-	Serra da Capivara-PI
PSD 13	Coleção UnB	UnB
PSD 14	Coleção UnB	UnB
PSD 15	Coleção UnB	UnB
PSD 16	Coleção UnB	UnB
PSD 7	Coleção UnB	UnB
PSD 9	Coleção UnB	UnB
PSD SOLO	Coleção UnB	UnB
RJ 1	<i>Solanum paniculatum</i>	UnB
RJ 1.1	<i>Solanum paniculatum</i>	UnB
RJ2	<i>Solanum paniculatum</i>	UnB
T3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Águas Lindas de Goiás-GO

4.4 Testes *in vitro* – Prospecção da antibiose por difusão em dupla camada

Inicialmente os isolados foram cultivados por 48 h, a 28 °C em meio 523 semi-sólido. Em seguida, foram transferidos dois isolados, em quatro pontos equidistantes na placa de Petri contendo meio 523 sólido. As placas foram incubadas nas condições citadas anteriormente, até que apresentassem crescimento evidente. Em câmara de fluxo laminar as placas foram invertidas e cada tampa foi forrada com discos de papel filtro de 90 mm. Com auxílio de uma micropipeta foram adicionados 1 mL de clorofórmio aos discos de papel. Após 20 min os discos de papel foram removidos e as placas voltadas para a posição normal com as tampas entreabertas por 30 min, para a eliminação de resíduos de clorofórmio (Figura 1). Concomitantemente, foi preparada uma suspensão de *R. solanacearum* isolada de tomate (estirpe UnB 1173, biovar 1) numa concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (equivalente a escala 7 de McFarland) de onde retirou-se 25 µL que foram adicionados a 5 mL de meio 523 semi-sólido (0,8% agar) fundente (48 °C). Imediatamente o meio com *R. solanacearum* foi sobreposto sobre o meio base, com o cuidado de formar uma camada homogênea sobre toda a superfície. Após dois dias de incubação, foi observado e medido com

uma régua o diâmetro dos halos de inibição formados (Romeiro, 2007; com modificações). Os ensaios foram realizados em três repetições.

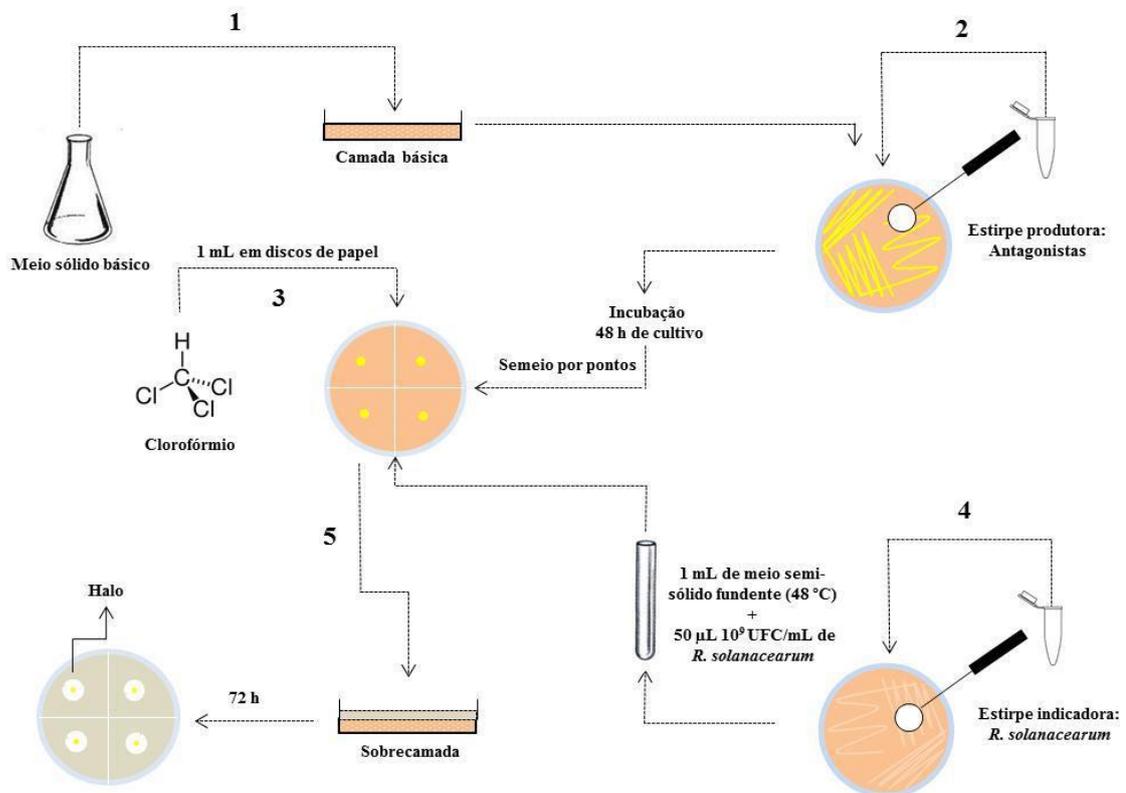


Figura 1. Etapas do teste *in vitro*, de antibiose por difusão em dupla camada, para seleção de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, segundo Romeiro (2007, com modificações) citado por Marques (2012).

4.5 Seleção dos isolados

Dos testes *in vitro* para a prospecção da antibiose foram selecionados 12 isolados, a partir da observação dos maiores diâmetros dos halos de inibição formados, para os experimentos *in vivo*.

4.6 Testes *in vivo*: Efeito dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes na supressão de *Ralstonia solanacearum* no tomateiro.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, da Estação Experimental de Biologia e no laboratório de Fitopatologia, ambos pertencentes à Universidade de Brasília (UnB), no período de março a junho de 2015.

Foram realizados dois ensaios para estudar a eficiência das bactérias antagonistas *in vitro* se teriam o mesmo desempenho *in vivo*. O experimento foi conduzido em casa de

vegetação, e o plantio foi realizado com sementes de tomate da cultivar Santa Clara, em bandejas de isopor com 128 células, contendo o substrato Plantmax®.

As mudas foram cultivadas até atingirem o estágio fisiológico de duas folhas verdadeiras. Para inoculação da bactéria *Pseudomonas* fluorescentes, foi preparada em laboratório 14 becker com 100 mL de água esterilizada, desses em 12 foi preparada uma suspensão bacteriana com *P. fluorescentes* ajustada para 1×10^9 UFC/mL (equivalente a escala 7 de McFarland) e ou outros 2 beckers somente com água esterilizada, um para controle positivo e outro para controle negativo.

As mudas de tomate tiveram a maior parte de suas raízes cortadas com tesoura e depois foram mergulhadas na suspensão de *Pseudomonas* fluorescentes durante uma hora, após esse tempo foram transplantadas em vasos contendo solo esterilizado. Após 48 h do transplante foi feita a inoculação no solo ao pé da raiz do tomateiro de 2 mL da suspensão bacteriana de *R. solanacearum* (estirpes UnB 1033, 1103 e 1173, biovar 1) ajustada para 1×10^8 UFC/mL.

E um ensaio nas mesmas condições acima citadas, mas com uma estirpe de *R. solanacearum* (estirpe UnB 1173, biovar 1).

As avaliações foram realizadas duas vezes por semana após o transplante, observando o sintoma de murcha em cada planta. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso. Foram testados 14 tratamentos, com 3 repetições de 5 plantas. Os dados gerados foram submetidos à análise de variância, no programa Assistat versão 7.7 beta (2015) (Silva, 2015). As variáveis, cujos efeitos de tratamento foram significativos, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade de erro.

5. Resultados

5.1 Isolamento de *Pseudomonas fluorescentes*

De 23 amostras de solo foram obtidos um total de 40 isolados de *Pseudomonas fluorescentes*. Assim, foram obtidos 1 isolado com camapu (*Physalis angulata*)(Mansidão-BA); 2 isolados com joá-de-capote (*Nicandra physaloides*) (Ceilândia-DF); 5 isolados com fumo (*Nicotiana tabacum*); 1 isolado com jurubeba (*Solanum paniculatum*)(Águas Lindas de Goiás-GO), 1 isolado com jurubeba (Brazlândia-DF); 14 isolados com jurubeba (Floresta Nacional de Brasília); 3 isolados com joá (*Solanum asperolantum*) (Unaí-MG) e 1 isolado da mesma espécie em Mansidão-BA; 1 isolado com uma pedra coletada na Serra da Capivara-PI; 10 isolados da coleção bacteriológica do laboratório de bacteriologia vegetal da UnB e 1 isolado com tomate (*Solanum lycopersicum*) (Tabela 4; Figura 2).

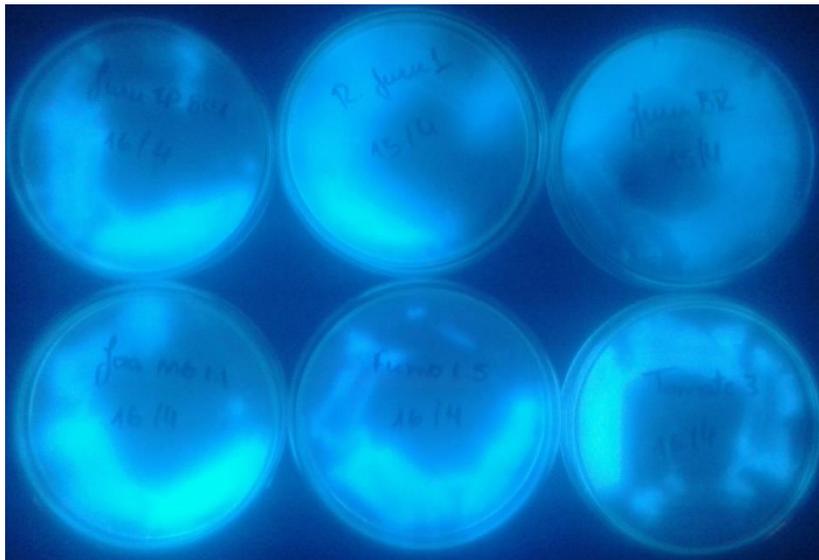


Figura 2. Isolados de *Pseudomonas fluorescentes* sob luz ultravioleta.

5.2 Testes *in vitro* – Prospecção da antibiose por difusão em dupla camada.

Nos testes de antagonismo *in vitro*, dos 40 isolados que foram selecionados a partir das amostras de solo provenientes de diferentes solanáceas do cerrado e cultivadas, 33 conseguiram inibir o crescimento de *R. solanacearum* nos testes *in vitro* (Tabela 5). Sendo que, os 12 isolados que obtiveram as maiores médias nos testes de antibiose, foram

selecionados para os testes *in vivo*. Os isolados selecionados para os testes em casa de vegetação foram (F 1.5, PEDRA, F 1.2, F 4.1, JOMG 1.1, JBR, T3, RJ 1.1, JOBA, PSD 9, JAL, JCP 8.1).

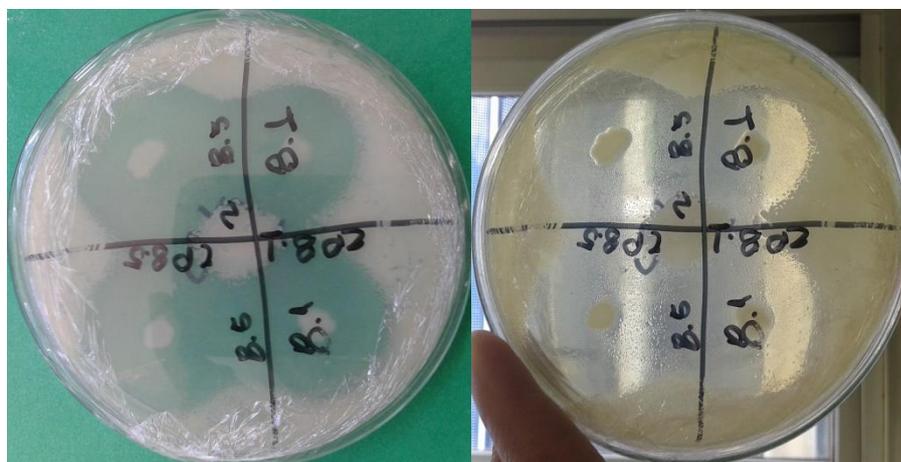


Figura 3. Teste de antibiose *in vitro* pelo método de difusão em dupla camada contra *Ralstonia solanacearum* isolado UnB 1173, halos de inibição formados pelos isolados JCP 8.1 e JCP 8.5.

Tabela 5. Inibição de *Ralstonia solanacearum* por isolados de *Pseudomonas* fluorescentes provenientes de diferentes solanáceas.

Isolado	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média*
CABA 3.1	0*	0	0	0
CADF	1,7	1,2	0	0,97
CADF1	0	2,5	3,5	2
F 1.2	4,1	3,05	3,3	3,48¹
F 1.5	4,4	3,25	4,5	4,05
F 2.2	2,2	3,05	2,2	2,48
F 4.1	3,3	1,95	4	3,08
F 5.2	0	0	0	0
JAL	3	2,6	3,5	3,03
JBR	4	2,15	3,9	3,35
JCP 1	0	0	4,3	1,43
JCP 1.1	1,1	0	0	0,37
JCP 2	0	0	2,5	0,83

JCP 4.1	2,2	2,9	2,5	2,53
JCP 4B	2,2	2,2	3,5	2,63
JCP 7	0	0	0	0
JCP 8.1	2,85	2,85	2,6	2,77
JCP 8.2	0	1,4	0	0,47
JCP 8.3	1,45	1,1	1,1	1,22
JCP 8.4	2,45	1,4	3	2,28
JCP 8.5	3,9	1,55	2,1	2,52
JCP 821	0	0	0	0
JCP 841	2	3,25	2,3	2,52
JOBA	2,9	1,8	4,6	3,1
JOMG 1.1	3	3,1	4	3,37
JOMG 1.2	1,4	2,95	2	2,12
JOMG 3.2	0	0	0	0
PEDRA	4,2	3,1	3,2	3,5
PSD 13	1,1	1,2	3,1	1,8
PSD 14	0	1,2	1,1	0,77
PSD 15	0	2,65	1,6	1,42
PSD 16	0	0	0	0
PSD 7	2,4	2,5	3,2	2,7
PSD 9	3	2,25	4	3,08
PSD SOLO	1,45	1,45	1,3	1,38
RJ 1	3,65	2	2,5	2,72
RJ 1.1	3,1	2	4,5	3,2
RJ2	2,1	1,9	0	1,33
T3	2,85	2,65	4,3	3,27

*Média dos diâmetros do halo de inibição em centímetros.

¹Em negrito os maiores diâmetros.

5.3 Testes *in vivo*: Efeito dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes na supressão de *Ralstonia solanacearum* no tomateiro.

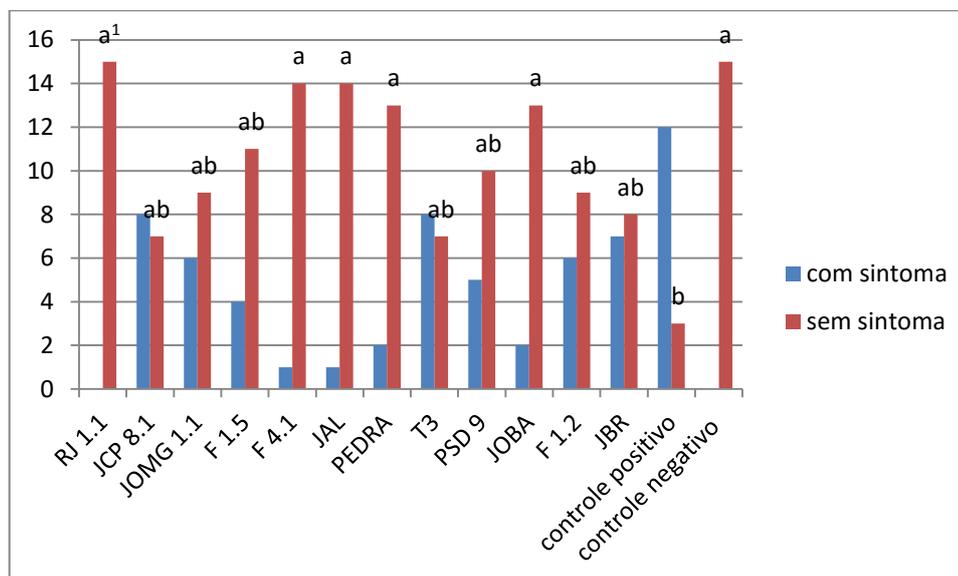
Todos os isolados conseguiram controlar a doença. Os isolados RJ 1.1, F 4.1 e JAL resultaram em melhor controle da Murcha Bacteriana. O isolado RJ 1.1 foi capaz de suprimir

o patógeno em 100% quando testado contra a estirpe UnB-1173. Os isolados F 4.1 e JAL reduziram em 93% a doença no tomateiro, no teste com uma estirpe de *R. solanacearum* (UnB 1173) (tabela 6; figura 4).

Tabela 6. Efeitos dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes no controle da Murcha Bacteriana causada por *R. solanacearum* UnB 1173.

Isolados	Com sintoma	Sem sintoma	% de Plantas com sintoma
RJ 1.1	0	15	0
JCP 8.1	8	7	53
JOMG 1.1	6	9	40
F 1.5	4	11	27
F 4.1	1	14	7
JAL	1	14	7
PEDRA	2	13	13
T3	8	7	53
PSD 9	5	10	33
JOBA	2	13	13
F 1.2	6	9	40
JBR	7	8	47
Controle positivo	12	3	80
Controle negativo	0	15	0

Figura 4. Relação entre plantas com e sem sintoma de Murcha Bacteriana, no experimento com a estirpe de *R. solanacearum* UnB 1173. Plantas tratadas com isolados de *Pseudomonas* fluorescentes.



¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade no teste Kruskal-Wallis

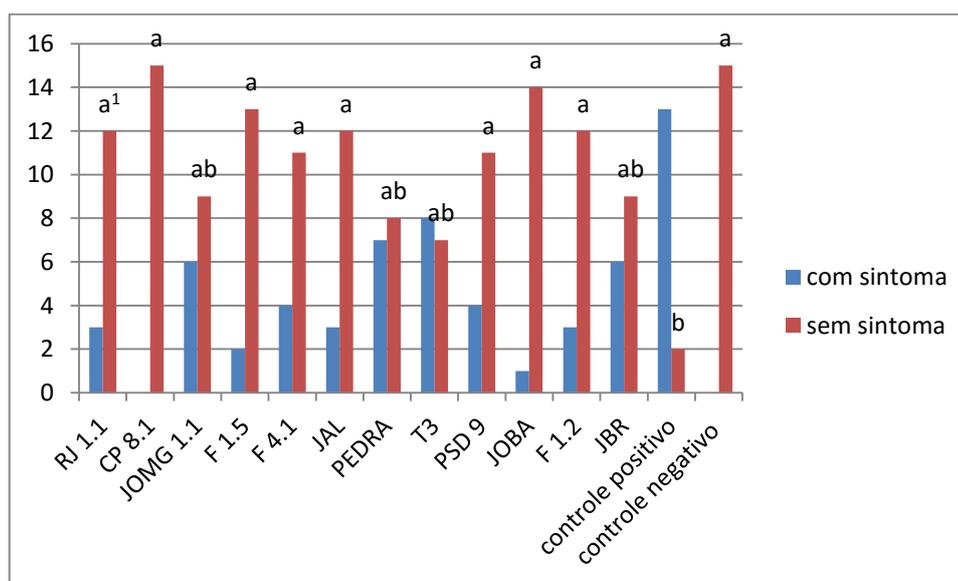
No experimento com mistura de três estirpes de *R. solanacearum* (UnB 1033, 1103, 1173). Todos os isolados conseguiram diminuir o aparecimento da doença. Os isolados JCP 8.1, JOBA e F 1.5 conseguiram os melhores resultados no controle da doença. Sendo que, o isolado JCP 8.1 conseguiu suprimir o patógeno em 100% quando testado contra a mistura de três estirpes de *R. solanacearum* (tabela 7; figura 5).

Tabela 7. Efeitos dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes no controle da Murcha Bacteriana causada pela mistura das estirpes UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173 de *R. solanacearum*.

Isolados	Com sintoma	Sem sintoma	% de plantas com sintomas
RJ 1.1	3	12	20
JCP 8.1	0	15	0
JOMG 1.1	6	9	40
F 1.5	2	13	13
F 4.1	4	11	27

JAL	3	12	20
PEDRA	7	8	47
T3	8	7	53
PSD 9	4	11	27
JOBA	1	14	7
F 1.2	3	12	20
JBR	6	9	40
Controle positivo	13	2	87
Controle negativo	0	15	0

Figura 5. Relação entre plantas com e sem sintoma de Murcha Bacteriana, no experimento com a mistura das estirpes UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173 de *R. solanacearum*. Plantas tratadas com isolados de *Pseudomonas* fluorescentes.



¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade no teste Kruskal-Wallis.

Houve diferenças no controle da murcha quando os antagonistas foram testados contra as diferentes estirpes de *R. solanacearum*, nos testes com uma estirpe (UnB 1173), 5 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes (RJ 1.1, F 4.1, JAL, PEDRA e JOBA) conseguiram controlar significativamente a murcha (Tabela 6; Figura 4). Nos testes com a mistura de três estirpes de

R. solanacearum (UnB 1033, 1103 e 1173), 8 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes (RJ 1.1, F 1.2, F 1.5, F 4.1, JCP 8.1, PSD 9, JOBA e JAL) conseguiram controlar significativamente a doença (Tabela 7; Figura 5).

Tabela 8. Análise estatística do efeito dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes no controle de *R. solanacearum* estirpe UnB 1173 e o halo de inibição produzido *in vitro*.

Tratamentos	Repetições	Soma dos postos	Média	Alfa-5%	Halo de inibição Φ cm
RJ 1.1	15	1117.5000	74.5	a ¹	3,2
JCP 8.1	15	1957.5000	130.5	ab	2,77
JOMG 1.1	15	1747.5000	116.5	ab	3,37
F 1.5	15	1537.5000	102.5	ab	4,05
F 4.1	15	1222.5000	81.5	a	3,08
JAL	15	1222.5000	81.5	a	3,03
PEDRA	15	1327.5000	88.5	a	3,5
T3	15	1957.5000	130.5	ab	3,27
PSD 9	15	1642.5000	109.5	ab	3,08
JOBA	15	1327.5000	88.5	a	3,1
F 1.2	15	1747.5000	116.5	ab	3,48
JBR	15	1852.5000	123.5	ab	3,35
Controle (+)	15	2377.5000	158.5	b	-
Controle (-)	15	117.5000	74.5	a	-

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade no teste Kruskal-Wallis.

Tabela 9. Análise estatística do efeito dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes no controle da mistura de três estirpes (UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173) de *R. solanacearum* e o halo de inibição produzido *in vitro*.

Tratamentos	Repetições	Soma dos postos	Média	Alfa-5%	Halo de inibição Φ cm
-------------	------------	-----------------	-------	---------	----------------------------

RJ 1.1	15	1447.5000	96.5	a ¹	3,2
JCP 8.1	15	1132.5000	75.5	a	2,77
JOMG 1.1	15	1762.5000	117.5	ab	3,37
F 1.5	15	1342.5000	89.5	a	4,05
F 4.1	15	1552.5000	103.5	a	3,08
JAL	15	1447.5000	96.5	a	3,03
PEDRA	15	1867.5000	124.5	ab	3,5
T3	15	1972.5000	131.5	ab	3,27
PSD 9	15	1552.5000	103.5	a	3,08
JOBA	15	1237.5000	82.5	a	3,1
F 1.2	15	1447.5000	96.5	a	3,48
JBR	15	1762.5000	117.5	ab	3,35
Controle (+)	15	2497.5000	166.5	b	-
Controle (-)	15	1132.5000	75.5	a	-

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade no teste Kruskal-Wallis.

Na correlação entre os diâmetros dos halos de inibição e o desempenho dos isolados nos testes em casa de vegetação, nota-se que não existe uma correlação concreta entre o desempenho *in vitro* com o *in vivo* (Tabela 8 e 9).

Tabela 10. Relação entre o diâmetro médio dos halos de inibição produzido por *Pseudomonas fluorescentes* e o controle de Murcha Bacteriana do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum*.

Isolados Pf	Diâmetro (cm)	Média (1)	Média (3)	Alfa-5% (1)	Alfa-5% (3)
RJ 1.1	3,2	74.5	96.5	a ¹	a ¹
JCP 8.1	2,77	130.5	75.5	ab	a
JOMG 1.1	3,37	116.5	117.5	ab	ab
F 1.5	4,05	102.5	89.5	ab	a
F 4.1	3,08	81.5	103.5	a	a
JAL	3,03	81.5	96.5	a	a
PEDRA	3,5	88.5	124.5	a	ab

T3	3,27	130.5	131.5	ab	ab
PSD 9	3,08	109.5	103.5	ab	a
JOBA	3,1	88.5	82.5	a	a
F 1.2	3,48	116.5	96.5	ab	a
JBR	3,35	123.5	117.5	ab	ab
Controle (+)	-	158.5	166.5	b	b
Controle (-)	-	74.5	75.5	a	a

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade no teste Kruskal-Wallis.

Média (1) transformada da estirpe UnB 1173 de *Ralstonia solanacearum*

Média (3) transformada da mistura das estirpes UnB 1033, UnB 1103 e UnB 1173 de *Ralstonia solanacearum*.

Pf = *Pseudomonas fluorescens*

Em negrito, isolados que estatisticamente tiveram desempenhos iguais nos dois ensaios.

Na correlação dos resultados dos dois ensaios, 4 isolados (RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA) de *Pseudomonas* conseguiram controlar a doença (Tabela 10).



Figura 6. A-Sintoma de murcha em tomate. B- teste do copo feito em planta com sintoma de murcha.

6. Discussão

O controle da Murcha Bacteriana em condições de campo tem sido estudado há décadas (Kelman, 1953), e os meios disponíveis para tal são ainda limitados (Pradhanang *et al.*, 2005), devido à complexidade da doença.

Viabilizar o controle biológico da Murcha Bacteriana do tomateiro é tarefa desafiadora, pela dificuldade de se encontrar agentes promissores e por se tratar de uma 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. A capacidade que a *Pseudomonas* fluorescentes tem de crescer e

colonizar o sistema radicular da planta rapidamente impediria a entrada do patógeno de se fixar no ponto de entrada e atingir os tecidos vasculares da planta. Além disso, essa rizobactéria pode induzir a resistência sistêmica da planta ou ter um efeito inibidor direto sobre o patógeno (Kloepper *et al.*, 1980). Apesar de se preconizar a seleção de agentes de biocontrole seja realizada na planta de interesse, no presente trabalho, a seleção foi feita em plantas da mesma família botânica da planta de interesse, mas essa metodologia conseguiu ser eficiente e permitiu a obtenção de rizobactérias capazes de reduzir e evitar a doença.

Espécies de *Pseudomonas* fluorescentes são amplamente estudadas para a sua utilização no controle biológico de doenças de solo (Weller *et al.*, 2007; Quagliotto *et al.*, 2009; Couillerot *et al.*, 2009; Shruti & Naveen, 2012) e de *R. solanacearum* em tomate e batata (Kloepper *et al.*, 1980; Aspiras & Dela Cruz, 1986; Guo *et al.*, 2004; Kuarabachew *et al.*, 2007; Vanitha *et al.*, 2009). No presente estudo se buscou novas fontes de isolados para essas rizobactérias, escolheu espécies do cerrado que fossem da mesma família botânica do tomateiro. A diversidade de espécies vegetais do cerrado nativo contribui para a maior diversidade de compostos orgânicos depositados na rizosfera, o que constitui fator favorável à sobrevivência e crescimento dos diferentes grupos de microrganismos do solo (D'Andrea *et al.*, 2002).

Segundo Weller (1988) nem sempre existe correlação entre a capacidade de uma bactéria inibir um patógeno *in vitro* e controlar a doença. Isolados que produzem zonas de inibição em meio de cultura, nem sempre são os melhores agentes no controle biológico. Isso pode ser visto neste ensaio, os isolados com maiores halos de inibição (F 1.5, PEDRA, F 1.2, JOMG 1.1, JBR) não tiveram o mesmo desempenho no ensaio em casa de vegetação, os isolados JOMG 1.1 e JBR não conseguiram diferir estatisticamente do controle negativo.

Para este trabalho o método de inoculação escolhido foi o de imersão de raízes em suspensão com o corte de quase todas as raízes antes da imersão. O método de imersão de

raízes em suspensão de antagonistas permite colonização prévia de nichos pela microbiota do solo, ocorrendo competição com os agentes veiculados na suspensão (Kloepper & Beauchamp, 1992), mas a retirada de quase todas as raízes na hora da inoculação e imersão pode acelerar a colonização dos vasos da planta por parte das *Pseudomonas* fluorescentes.

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, 2007). Em seus estudos Zhou *et al.*, (2014), conseguiu associar a produção do antibiótico (2,4-DAPG) ao controle da Murcha Bacteriana por *Pseudomonas fluorescens*, demonstrou também a capacidade que essas rizobactérias tem de produzir um biofilme, ajudando na colonização desses microrganismos e na resistência ao estresse ambiental. Neste estudo, das 40 rizobactérias selecionadas inicialmente, 33 conseguiram produzir alguma substância que impediu o crescimento de *R. solanacearum in vitro*. Os testes *in vitro* com bactérias promissoras auxiliam no entendimento dos mecanismos de ação desses antagonistas. Contudo, Aliye *et al.*, (2008) afirmam que existe relação entre testes em laboratórios e casa de vegetação. Por outro lado, Ran *et al.*, (2005) não encontraram tal relação. Vale ressaltar que apesar de a maioria dos resultados apresentarem correlação entre testes *in vitro* e *in vivo* não significa que o maior diâmetro de inibição equivale ao melhor controle.

Em seu trabalho, Murthy *et al.*, (2014), identificou 10 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes que foram selecionados da rizosfera de diferentes campos de tomate, destes 3 conseguiram inibir *in vitro* uma cepa altamente virulenta de *R. solanacearum*, aumentar o vigor das plântulas de tomate, mesmo após a inoculação do patógeno, além de induzir a atividade de enzimas relacionadas com a resistência induzida. Nesse estudo, o autor atribuiu os seus resultados a adaptação dos isolados a rizosfera do tomateiro e a capacidade deste

utilizar os exsudatos de sua planta hospedeira original. No presente trabalho verificou se que mesmo isolados oriundos de plantas da mesma família botânica conseguem controlar a doença. Szentes *et al.*, (2013) estudando as bactérias provenientes da rizosfera de briófitas identificou diversos gêneros, desses predominaram *Pseudomonas*, *Serratia* e *Bacillus*. Nos estudos *in vitro* conseguiram dois isolados que conseguiram inibir o crescimento de *R. solanacearum*, sendo um desses identificado como *Pseudomonas fluorescens*.

Os resultados dos dois ensaios realizados neste trabalho estão em acordo com diversos trabalhos em que se estuda o desempenho de *Pseudomonas* fluorescentes no biocontrole de *R. solanacearum*. Em seus estudos Singh & Siddiqui (2015) testaram o desempenho de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus awamori* contra três patógenos *R. solanacearum*, *Meloidogyne javanica* e *Xanthomonas compestris* pv. *vesicatoria* em tomate, a combinação destes três potenciais antagonistas diminuíram o índice de murcha em relação ao controle positivo, de índice 5 para 3-2, principalmente quando inoculados juntos. *P. fluorescens* conseguiu colonizar mais eficientemente a raiz da planta que os outros microrganismos deste estudo.

Também obtiveram resultados semelhantes Maji & Chakrabartty (2014), um isolado *Pseudomonas* sp. melhorou a porcentagem da emergência de plântulas de tomate em relação ao controle com o patógeno, melhorou o peso fresco, peso seco e índice de vigor promovendo o crescimento dessas.

Abo-Elyousf *et al.*, (2012) conseguiram resultados significativos na indução de resistência no tomateiro utilizando *Pseudomonas fluorescens* e acibenzolar-s-metil e na redução da Murcha Bacteriana, reduziram a severidade da doença em 58 e 56%, respectivamente, em plantas de tomate. A redução da doença foi mais elevada (72%) com aplicação combinada dos dois tratamentos.

A capacidade de colonização das *Pseudomonas* spp., produção de antibióticos e indução de resistência vista nos trabalhos citados, corroboram com os resultados do presente trabalho, visto que, nove dos doze isolados selecionados para os experimentos conseguiram controlar a doença. Dentre os nove isolados que se destacaram nos ensaios em casa de vegetação; cinco isolados de *Pseudomonas* fluorescentes conseguiram controlar a doença no ensaio com uma estirpe do patógeno (RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA e PEDRA); oito isolados de *Pseudomonas* conseguiram controlar a doença no ensaio com três estirpes do patógeno (RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA, JCP 8.1, F 1.5, PSD 9, F 1.2); desses nove isolados, quatro conseguiram controlar a doença tanto no ensaio com uma estirpe do patógeno, quanto com três estirpes (RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA).

Quando se relacionam os diâmetros e o desempenho dos isolados em casa de vegetação no ensaio com uma estirpe de *R. solanacearum*, nota-se que os isolados que obtiveram os maiores halos, não foram que controlaram a doença, nesse ensaio 5 isolados de *Pseudomonas* (RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA e PEDRA) conseguiram controlar a doença.

Já no ensaio com três estirpes de *R. solanacearum*, houve uma ocorrência de dois isolados com os maiores halos, também controlarem a doença, nesse ensaio oito isolados conseguiram controlar a doença, diferentemente do esperado. Nesses dois ensaios, o esperado seria o ensaio que com uma estirpe, os isolados de *Pseudomonas* controlassem mais a doença, visto que a variabilidade é menor, mas a estirpe de *R. solanacearum* pode ser mais virulenta que as outras duas, o que não se aplica nesse caso, porque a mesma estirpe está presente nos dois ensaios.

Na correlação entre os resultados dos dois ensaios, quatro isolados de *Pseudomonas* (RJ 1.1, F 4.1, JAL, JOBA) conseguiram controlar a doença, esses isolados conseguiram o controle da doença em 93% das plantas, sendo o isolado RJ 1.1 conseguiu o controle de 100% da doença, nos dois ensaios esses isolados tiveram melhor desempenho.

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; Klopper & Beauchamp, 1992). Os isolados RJ 1.1, F 4.1, JAL e JOBA conseguiram demonstrar essas habilidades visto que conseguiram o controle da doença nos dois ensaios, com uma estirpe e com a mistura de três estirpes de *R. solanacearum*.

Os principais agentes de controle biológico contra *R. solanacearum* são principalmente espécies de *Pseudomonas* (Dong *et al.*, 1999; Gou *et al.*, Smith & Saddler, 2001). Sendo assim, no presente trabalho isolados de *Pseudomonas* fluorescentes conseguiram controlar o patógeno tanto em laboratório quanto em casa de vegetação. 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. Testes adicionais são necessários para averiguar quais mecanismos estão envolvidos no antagonismo exercido pelas rizobactérias selecionadas, em especial, as que obtiveram melhor desempenho.

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 de inóculo e agressividade do patógeno contribuam para a reversão da expectativa da confirmação da eficiência dos agentes promissores.

7. Conclusões

- 40 isolados foram obtidos a partir de amostras de solos provenientes da rizosfera de plantas do cerrado e cultivadas;
- 33 isolados conseguiram inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum in vitro*;
- 9 isolados conseguiram inibir a Murcha Bacteriana do tomateiro em condição de casa de vegetação;
- 4 isolados conseguiram inibir a doença tanto no ensaio com uma estirpe do patógeno quanto com a mistura de três estirpes do mesmo.
- Esses quatro isolados se mostraram potenciais agentes de controle biológico contra a Murcha Bacteriana.

8. Referências bibliográficas

- ABO-ELYOUSR, K.A.M; IBRAHIM, Y.A. & BALABEL, N.M. 2012. Induction of Disease Defensive Enzymes in Response to Treatment with acibenzolar-S-methyl (ASM) and *Pseudomonas fluorescens* Pf2 and Inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 (phylotype II). *Journal of Phytopathology* 160:382-389.
- AGRIOS, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier. Amsterdam. p.952.
- 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*, CAB International, Wallingford. p. 179-198
- ALIYE, N.; FININSA, C. & HISKIAS, Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*. 47:282–288.
- ALVAGENGA, M.A.R. 2004. Origem, Botânica e Descrição da Planta. *In*: Alvarenga MAR (Ed.) *Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia*. UFLA. Lavras-MG. p.15-23.
- ANTOUN, H. & KLOEPPER, J.W. 2001. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *In*: Brenner, S. & Miller, J.H. (eds) *Encyclopedia of genetics*. Academic, New York, p 1477–1480.
- ASPIRAS, R.B. & DE-LA CRUZ, A.R. 1986. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*. *In*: Persley GJ. (eds) *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific*. Canberra, ACIAR proceedings13, ACIAR, p. 89–92.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. 1974. *Biological control of plant pathogens*. WF. Freeman. San Francisco, USA.
- BETTIOL, W. 1991. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. *In*: Bettiol, W *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. p. 1-5.
- BETTIOL, W. 2001. Resultados de pesquisa com métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. *In*: Hein, M. (org) *Resumos do 1º Encontro de Processos de Proteção de Plantas: controle ecológico de pragas e doenças*. Botucatu-SP. Agroecológica, p. 125-135.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R.R.L.; MICHEREFF, S.J.; MATTOS, L.P.V.; ALVARADO, I.C.M.; & PINTO, Z.V. 2009. Supressividade de fitopatogenos habitantes do solo. *In*: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (Eds.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, p.187-208.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; JUNIOR, T.J.P.; CORREA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. 2012. Produtos à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. p.135.

BRIMER, C.D.; & MONTIE, T.C. 1998. Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *Journal of Bacteriology*. 180:3209-3217.

BRUNETTA, J.M.F.C 2008. Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus spp.* Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BUDDENHAGEN, I.W.; & KELMAN, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 2:203-230.

BUDDENHAGEN, I.W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.

BUNDY, J.G.; PATON, G.I.; CAMPBELLA, C.D. 2004. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1149–1159.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press. St. Paul. p. 539

COUILLEROT, O.; PRIGENT-COMBARET, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; MENNE-LOCCOZ, Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letter in Applied Microbiology*. 48:505–512.

COUTINHO, T.A. 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In: Allen, C.P.; Prior, P.; Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS press. St. Paul. p.29-38.

D'ANDREA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & CARNEIRO, M.A.C. 2002. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na Região do Cerrado do Sul do Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. 26:913-923.

DENNY, T.P. 2005. A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. In: Allen, C.P.; Prior, P.; Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. MN: APS press. St. Paul. p. 323-334.

DONG, C.; ZENG, X.; LIU, Q. 1999. Biological control of tomato bacterial wilt with avirulent bacteriocinogenic strain of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of China Agricultural University* 20:1-4.

EMBRAPA. 2015. Fitossanidade do tomateiro. <http://www.cnpq.embrapa.br/fttomateiro/index.html>. Consultado em 23/09/2015.

FAOSTAT. FAO. 2014. Statistical Databases <http://faostat.fao.org> . Consultado em: 23/09/2015.

FERGAN, M.; & PRIOR, P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species?” In: Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. MN:APS press. St. Paul. p. 449-461.

FILGUEIRA, F.A.R. 2000. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Ed. UFV. Viçosa. p.189.

FILGUEIRA, F.A.R. 2003. Novo manual de olericultura; Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2º ed. Ed. UFV. Viçosa: p. 412

FRAVEL, D.R. 1988. Role in antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology. 26:75-91.

GAMALERO, E.; LINGUA, G.; BERTA, G.; LEMANCEAU, P. 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. Agronomie. 23:407-418.

GENIN, S.; BOUCHER, C. 2002. Pathogen Profile: *Ralstonia solanacearum*. Molecular Plant Pathology. 33:111-118.

GONZALEZ, E.T.; ALLEN, C. 2003. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. Molecular Plant-Microbe Interactions. 16:536-544.

GREY, B.; STECK, T.R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Applied and Environmental Microbiology. 67:3866–3872.

GUO, J.H.; QI, H.Y.; GUO, Y.H.; GE, H.L.; GONG, L.Y.; ZHANG, L.X.; SUN, P.H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Biological Control. 29:66-72.

GUO, L.H.; GUO, Y.H.; ZHANG, L.X.; QI, H.Y.; FANG, Z.D. 2001. Screening for biocontrol agents against cayenne pepper bacterial wilt. China Journal Biological Control. 17:101-106.

HARTMAN, G.L.; HONG, W.F.; HAYWARD, A.C. 1993. Potential of biological and chemical control of bacterial wilt. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter. 45: 322-326

HAYWARD, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review Phytopathology. 29:65-87.

HAYWARD, A.C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward, A.C.; Hartmann, G.L. (Eds.) Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB. Wallingford. p. 123-35.

HERNÁNDEZ, A. 2000. Características de géneros asociados a los cultivos de gerbera y clavel. Cultivos Tropicales 21(3): 15-18.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Abril/2014.

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201301.pdf

JACOBSEN, B.J.; ZIDACK, N.K.; LARSON, B.J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. Phytopathology. 94:1272–1275

KADO, C.I. 2010. Plant Bacteriology. APS. St. Paul. p. 143-152

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology. 60:969-976.

KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology. 44: 693- 695.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 44:301-307.

KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. 1992. A review of issues to measuring colonization of plant-roots by bacteria. Canadian Journal Microbiological. 38:1219-1232.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Angers, France, p. 879–882.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. 1980. Effect of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology. 70:1078-1082.

KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G.W.; WEI, G. 1997. Multiple disease protection by rhizobacteria that induced systemic resistance- historical precedence. Phytopathology. 87:136-137.

KURABACHEW, H.; ASSEFA, F.; HISKIAS, Y. 2007. Evaluation of Ethiopian isolates of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*. Acta Agriculturae Slovenica. 90:125–130.

LIÃO, C.H. 1989. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopatogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agente. Plant Disease. 73:223-226.

- LOPES, C.A. & QUEZADO-DUVAL, A.M. 2005. Doenças bacterianas. *In*: Lopes, C.A.; Ávila, A.C. (Eds.) Doenças do Tomateiro. Brasília-DF. Embrapa Hortaliças. p. 18-51.
- LOPES, C.A. & QUEZADO-SOARES, A.M. 1997. Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle. Brasília-DF. Embrapa-CNPB.
- LOPES, C.A. & QUEZADO-SOARES, A.M. 2000. Doenças causadas por bactérias em tomate. *In*: Zambolim, L. Vale, F.X.R.; Costa, H. (Eds.) Controle de doenças de plantas-hortaliças. Volume 2. Ed. UFV. Viçosa. p. 757-799.
- LOPES, C.A. & REIS, A. 2011. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. Brasília. Embrapa-CNPB. p. 10 (Embrapa Hortaliças. Circular técnica, 100)
- LOPES, C.A. 2009. Murchadeira bacteriana ou murchadeira- uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília-DF. Embrapa Hortaliças. (Comunicado técnico 67).
- LOPES, C.A.; & ÁVILA, A.C. 2005. Doenças do Tomateiro. Brasília-DF. Embrapa Hortaliças.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 86:1-25.
- LYNCH, J.M. 1990. Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. *In*: Lynch, J.M. (ed) *The rhizosphere*. Wiley, Chichester, p. 1–10.
- MAJI, S.; CHAKRABARTTY, P.K. 2014. Biocontrol of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* by isolates of plant growth promoting rhizobacteria. *Australian Journal of Crop Science*. 8(2):208-214.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F. 2007. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathologica*. 24:9-88.
- MARIANO, R.L.R. 1993. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 1:369-409.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. 2004. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife 1:89-111.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. 2005. Identificação de bactérias fitopatogênicas. *In*: Mariano, R.L.R.; Silveira, E.B. (Eds.) *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. 2º edição. UFRP. Recife. p. 67-111.
- MARQUES, E. 2012. Murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum* Raça 3 biovar 2T: etiologia, influência do solo e controle. Tese de doutorado (Doutorado em Fitopatologia). Universidade de Brasília. Brasília-DF.

- MEHAN, V.K.; LIAO, B.S. 1994. Groundnut bacterial wilt: past, present, and future. *In*: Mehan, V.K.; McDonald, D. (Eds.) Groundnut Bacterial Wilt in Asia, proceedings of the Third Working group Meeting, OCRI, Wuhan, China, p. 67-88
- MELO, I.S. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 4(1):261-295.
- MICHEL, V.; HARTMAN, G.L.; MIDMORE, D.J. 1996. Effect of previous crop on soil population of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. *Plant Disease*. 80:1367- 1372.
- MURTHY, K.N.; UZMA, F.; CHITRASHREE, C.S. 2014. Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. *American Journal of Plant Sciences*. 5:1799-1811.
- PALLERONI, N.J. 1984. Pseudomonadaceae. *In*: Bergey's Manual of Systematic Biology. Kreig, N.R., & Holt, J.G. (eds). The Williams and Wilkins Co. Baltimore. p. 141-199.
- PAULITZ, T.C. 1990. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. *In*: BAKER, R. R. (Ed.) New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Liss. New York. p. 713-724
- PAULSEN, I.T.; PRESS, C.M.; RAVEL, J.; KOBAYASHI, D.Y.; MYERS, G.S.A.; MAVRODI, D.V.; DEBOY, R.T.; SESHADRI, R.; REN, Q.; MADUPU, R.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; BRINKAC, L.M.; DAUGHERTY, S.C.; SULLIVAN, S.A.; ROSOVITZ, M.J.; GWINN, M.L.; ZHOU, L.; SCHNEIDER, D.J.; CARTINHO, S.W.; NELSON, W.C.; WEIDMANS, J.; WATKINS, K.; TRAN, K.; KHOURI, H.; PIERSON, E.A.; PIERSON, L.S. 3rd, THOMASHOW, L.S.; LOPER, J.E. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*. 23(7):873–878.
- PEIXOTO NETO, P.A. de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. de 2002. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 29:62-77.
- PRADHANANG, P.M.; JI, P.; MOMOL, M.T.; OLSON, S.M.; MAYFIELD, J.L.; JONES, J.B. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*. 89: 889-893.
- PRESCOTT, M.L.; HARLEY, J.; DONALD, P.; KLEIN, A. 1999. *In*: Antimicrobial chemotherapy. Microbiology 2nd edition. published by C. Brown Publishers, U.S.A. p. 325.
- QUAGLIOTTO, L.; AZZIZ, G.; BAJSA, N.; VAZ, P.; PÉREZ, C.; DUCAMP, F.; CADENAZZI, M.; ALTIER, N.; ARIAS, A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control*. 51:42-50
- RAJENDRA, L.; SAMIVAPPAN, R.; RAGUCHANDER, T.G.; SARAVANAKUMAR, D. 2006. Endophytic bacterial induction of defense enzymes against bacterial blight of cotton.

Phytopathologia Mediterrenea. 45:203-214.

HAGGAG, W.M.; MALAKA, A.E.S.; MOSTAFA, A.E. 2012. Semi - Industrial Processes of *Verticillium lecanii* Producing Chitinase for Controlling of Grape Powdery Mildew. European Journal of Scientific Research. 91(1):41-57.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant and Soil. 239:55-68.

RAN, L.X.; LIU, C.Y.; WU, G.J.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* fluorescente *Pseudomonas* spp. in China. Biological Control. 32:111-120.

ROMANTSCHUK, M. 1992. Attachment of plant pathogenic bacteria to the surface of plants. Annual Review of Phytopathology. 30:225-243.

ROMEIRO, R.S. 2007. Controle Biológico de Doenças de Plantas: fundamentos. Ed. UFV. Viçosa. MG.

SAILE, E.; MCGARVEY, J.A.; SCHELL, M.A.; DENNY, T.P. 1997. Role of Extracellular Polysaccharide and Endoglucanase in Root Invasion and Colonization of Tomato Plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology. 87: 1264-1271.

SHRUTI, M.; NAVEEN, K.A. 2012. Management of black rot in cabbage by rhizospheric *Pseudomonas* species and analysis of 2,4-diacetylphloroglucinol by qRT-PCR. Biological Control. 61(1):32-39.

SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O.; CARDOSO, E.J.B.N. 1995. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. Revista Brasileira de Ciências do Solo. 19:205-211.

SILVEIRA, E.B. 2001. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: Michereff, S.J.; Barros, R. (Eds.) Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável. UFRPE. Recife. p. 78-107.

SILVEIRA, J.R.P.; DUARTE, V.; MORES, M.G.; OLIVEIRA, A.M.R.; BARNI, V.; MACIEL, J.L.N. 2005. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. Fitopatologia Brasileira. 30:615-622.

SINGH, N.; SIDDIQUI, Z.A. 2015. Effects of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Aspergillus awamori* on the wilt-leaf spot disease complex of tomato. Phytoparasitica. 43:61-75.

SMITH, J.J.; SADDLER, G.S. 2001. The use of avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* to control bacterial wilt disease. In: Jeger, M.J.; Spence, N.J. (Eds.) Biotic Interactions in Plant-Pathogen Association. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 159-176.

- SOTTERO, A.N. 2003. Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas
- SZENTES, S.; RADU, G-L.; LASLO, É.; LANY, S.; MARA, G. 2013. Selection and evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. *Crop Protection*. 52:116-124.
- TAKATSU, A. & LOPES, C.A. 1997. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira*. 15:170-177.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36:453-483.
- VANITHA, S.C.; NIRANJANA, S.R.; MORTENSEN, C.N.; UMESHA, S. 2009. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol*. 54:685-695.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 26:379-407.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the New Genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. 36:1251-1275.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov., *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904.
- ZHOU, T-T.; LI, C-Y.; CHEN, D.; WU, K.; SHEN, Q-R.; SHEN, B. 2014. phlF mutant of *Pseudomonas fluorescens* J2 improved 2,4-DAPG biosynthesis and biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt. *Biological Control* 78:1-8.