

Juliana Mattana

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O
CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do Grau
de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo
Di Piero

Florianópolis - SC
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mattana, Juliana
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFITICAS PARA O
CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO /
Juliana Mattana ; orientador, Prof. Dr. Robson
Marcelo Di Piero - Florianópolis, SC, 2017.
107 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. bactérias
endofíticas. 3. biocontrole. 4. mancha foliar. 5.
Xanthomonas gardneri. I. , Prof. Dr. Robson Marcelo
Di Piero. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biociências. III. Título.

Juliana Mattana

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.

Local, 24 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Mario Steindel
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero - Orientador - UFSC

Prof. Dr. Admir José Giachini
UFSC

Prof. Dr. Rubens T. Delgado Duarte – UFSC

Prof.^a Dr.^a Aline Cristina Velho
UFSC

Prof. Dr. Marciel J. Stadnik
UFSC

Prof. Dr. Bernardo de A. Halfeld Vieira - EMBRAPA (Videoconferência)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade;

Ao Professor Dr. Robson Marcelo Di Piero pelos ensinamentos, dedicação e pela orientação em todas as etapas do trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

Aos Professores do Programa pelo incentivo e ensinamentos;

Aos Prof. Dr. José Rogério e Dr. Lívio da Silva Amaral pelo auxílio e cessão do isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*;

Ao Francisco Xavier Ines Nascimento pelo auxílio inestimável na condução de parte do trabalho de caracterização dos isolados;

Aos Professores Admir José Giachini, Marciel João Stadnik, Rubens Tadeu Delgado Duarte, Aline Cristina Velho e Bernardo de Almeida Halfeld Vieira que gentilmente aceitaram participar da banca examinadora;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia: Argus, Giana, Pedro, Paulo, Ludiane, Bruna, Zamira, Julia, Rafael, Eduardo, Marlon, Guilherme, Mateus, Mathias e Aline pela convivência e pela troca de aprendizados;

Às minhas queridas sócias da Fitocon Juliane, Carol e Tarsis pela incrível lição de competência, dedicação e profissionalismo;

A todos os que de alguma forma colaboraram nas diferentes etapas deste trabalho;

Ao meu marido Daniel, pelo apoio incondicional e pela compreensão das ausências ao longo desta jornada;

A meus pais.

"Nós estamos agora onde duas estradas divergem. [...] A estrada que há muito tempo viajamos é enganosamente fácil, uma autoestrada suave em que avançamos com grande velocidade, mas em seu fim está o desastre. A outra bifurcação da estrada - a menos percorrida - oferece o nosso passado, nossa única chance de chegar a um destino, que garante a preservação da terra ".

Rachel Carson, 1962

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um dos produtos hortícolas mais consumidos no mundo, seja na forma processada ou in natura. No Brasil, doenças foliares como a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas gardneri* (Xg) e a pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) são comuns e acarretam inúmeras perdas econômicas na produção de tomate. A crescente preocupação com saúde humana e ambiental tem incentivado diversas pesquisas em prol de uma agricultura mais sustentável. Estudos recentes têm demonstrado a potencialidade de uma vasta gama de micro-organismos endofíticos isolados a partir de diversas espécies vegetais para o controle de fitopatógenos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias a partir de diferentes genótipos de tomate e selecionar isolados para o controle biológico da mancha e da pinta bacteriana. Para isto, realizou-se o isolamento de 119 isolados bacterianos a partir de amostras de parte aérea, semente e raízes de 15 cultivares de tomate. Informações sobre a origem das amostras e características morfo-fisiológicas, dentre elas a morfologia de colônia, teste Gram, produção de pigmentos fluorescentes, amilase e pectinase, permitiram distinguir 34 isolados endofíticos. Para acessar o potencial dos mesmos no controle de doenças foliares do tomateiro, realizou-se uma seleção prévia com auxílio de metodologias *in vitro* contra os patógenos Xg e Pst. Na sequência avaliou-se por meio de ensaios em condições de casa de vegetação o efeito dos isolados na redução da severidade da mancha bacteriana causada por Xg. Ao todo, 24 isolados (70,54%) foram capazes de produzir sideróforos em meio Cromo Azurol S e 17 (50%) foram caracterizados como positivos para capacidade de solubilizar fosfato bicálcico. Onze isolados bacterianos inibiram o crescimento de Xg e três destes também apresentaram atividade antimicrobiana frente a Pst. As bactérias endofíticas selecionadas, isolados ISO043, ISO057, ISO137 e ISSO125 reduziram a severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em condições de casa de vegetação, em 2 experimentos independentes. Apenas o isolado ISO123 não diferiu da testemunha na avaliação feita aos 21 dias após a inoculação do patógeno, no 2º experimento. Após comparar o perfil de DNA dos isolados ISO043 e ISO137 gerado pela técnica de BOX-PCR, verificou-se que estes correspondem à mesma espécie do gênero *Pseudomonas* e provavelmente à mesma linhagem de bactéria. Apesar do nível de controle da bacteriose não diferir significativamente para os quatro isolados endofíticos promissores, os isolados ISO043 e ISO137 apresentam vantagens pois, esta linhagem de bactéria pode

colonizar tanto a parte aérea quanto a parte radicular do tomateiro. Além disso, esta linhagem é capaz de produzir sideróforos e solubilizar fosfatos inorgânicos. Mais estudos são necessários para verificar a eficácia da aplicação dos isolados obtidos neste trabalho em condições de campo e também a eficácia *in vivo* contra *P. syringae* pv. *tomato*. Entretanto, a possibilidade de uso destas bactérias é uma alternativa promissora para o controle de bacterioses foliares. Isto por que além da ação direta de compostos antimicrobianos, os endofíticos poderiam proporcionar um controle indireto de doenças vegetais devido à melhora nas condições nutricionais da planta.

Palavras-chave: Mancha bacteriana, *Xanthomonas gardneri*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, bactérias endofíticas, biocontrole.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most consumed vegetables in the world. In Brazil, foliar diseases such as the bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* (Xg) and the bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) are common and responsible for numerous economic losses in tomato production. Nowadays, the concern for human and environmental health has encouraged several studies in support of a more sustainable agriculture. Recent studies have demonstrated the potential of a wide range of endophytic microorganisms isolated from various plant species for control of phytopathogens. In this context, the objective of this work was to isolate bacteria from different tomato genotypes and to select isolates for the biological control of the spot and the bacterial pathogen. The isolation of 119 bacteria was made from samples of flowers, leaves, seeds and roots of 15 tomato cultivars. After that, information about the origin of the samples and morpho-physiological traits, among them the colony morphology, Gram test, production of fluorescent pigments, amylase and pectinase allowed to distinguish 34 endophytic isolates. To access their potential to control foliar diseases of tomato, a previous selection was made through *in vitro* methodologies against *X. gardneri* and *P. syringae* pv. *tomato*. The effect of the isolates in reducing the severity of bacterial spot caused by Xg was evaluated through greenhouse conditions. Twenty four isolates (70.54%) were able to produce siderophores in CAS medium and 17 (50%) were characterized as positive for the ability to solubilize dicalcium phosphate. Eleven endophytic isolates inhibited Xg *in vitro*, among these 3 isolates also presented antimicrobial activity against Pst. The selected endophytic bacteria isolates ISO043, ISO057, ISO137 and ISO125 reduced the severity of the bacterial spot caused by *X. gardneri* under greenhouse conditions in 2 independent experiments. Only the isolate ISO123 did not differ from the control in the second experiment. After comparing the DNA profile of the ISO043 and ISO137 isolates generated by the BOX-PCR technique, it was found that these correspond to the same species belonging to the genus *Pseudomonas* and probably the same bacterial strain. Despite the results *in vivo* do not differ between the selected endophytes, isolates ISO043 and ISO137 has advantages because this strain of bacteria can colonize both the phyllosphere and the rhizosphere of tomato plants. Furthermore, this strain is capable of producing siderophores and solubilizing inorganic phosphate. Further research is needed to verify the efficacy of application of the isolates obtained in this work under field conditions and also the efficacy against *P. syringae* pv.

tomato. However, the possibility of using this bacterial strain is a promising alternative for the control of foliar bacterioses. This is because besides the direct action of antimicrobial compounds, they could provide indirect control of plant diseases as a result of improvement in the nutritional status of the plant.

Keywords: Leaf spot, *Xanthomonas gardneri*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, endophytic bacteria, biological control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-Sintomas típicos da pinta bacteriana causada por *P. syringae* pv. *tomato* em folhas de tomateiro 33
- Figura 2 - Sintomas típicos da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em folhas de tomateiro. A) sintomas iniciais que aparecem a partir dos 7 dias após a infecção; B) sintomas de manchas circulares com halos amarelados após 14 dias da infecção..... 35
- Figura 3 - Caracterização morfológica das colônias, após o cultivo por 48h a 26±2°C em meio NA, de isolados obtidos a partir da parte aérea, raízes e sementes de plantas de diferentes cultivares de tomateiro. 65
- Figura 4 - Caracterização de isolados de bactérias endofíticas quanto à: (A) produção de pigmentos fluorescentes em meio KB sob luz UV $\lambda=366$ nm (ISO133, ISO137 e ISO110); (B) produção de sideróforos em meio CAS, evidenciada pela alteração da coloração do meio de azul para amarelo (ISO069)..... 67
- Figura 5 - Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico do isolado ISO112 cultivado em meio BDA-CaHPO₄. 67
- Figura 6 - Perfil BOX-PCR de 8 isolados de bactérias endofíticas e dos patógenos *X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato*. Imagem do gel de agarose a 1,5%, resultante de eletroforese mostrando os produtos de amplificação das bactérias..... 69
- Figura 7 - Ensaio de antibiose *in vitro* e presença de halos de inibição dos patógenos em torno da colônia dos isolados endofíticos. Patógeno avaliado em (A) *X. gardneri* e em (B) *P. syringae* pv. *tomato*..... 70
- Figura 8 - Crescimento das colônias bacterianas em meio de cultivo suplementado com amido solúvel 0,2%. Após incubar as placas por 48h a 26±2°C adicionaram-se 5 mL de solução de iodo Gram. As zonas de clareamento formadas em torno das colônias são indicativas da produção de amilase pelos isolados ISO044 (A) e ISO065 (B) 72
- Figura 9- Severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*) em plantas de tomateiro do 1º experimento, tratadas com suspensões bacterianas dos isolados selecionados *in vitro* devido à atividade antimicrobiana frente a

Pst e Xg: ISO057, ISO043 e ISO137 (D.O. 0,6 unidades de absorbância a 600nm). 75

Figura 10 - Severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*) em plantas de tomateiro do 2º experimento, tratadas com suspensões bacterianas dos isolados selecionados *in vitro* devido à atividade antimicrobiana frente a Pst e Xg (ISO057, ISO043 e ISO137) e devido à alta capacidade inibitória de Xg (ISO125 e ISO123) (D.O. 0,6 unidades de absorbância a 600nm). 76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estudos realizados com bactérias isoladas a partir de amostras de diferentes plantas cultivadas, para o controle biológico de doenças bacterianas..... 50
- Tabela 2 - Genótipos (cultivares/híbridos) de tomateiro utilizados nos experimentos para fins de isolamento de bactérias a partir de amostras de parte área, sementes e raízes. Descrição do tipo do fruto, forma de crescimento, fornecedor e resistência às bacterioses estudadas. 55
- Tabela 3 - Descrição das características morfológicas da colônia dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de plantas de tomateiro. 64
- Tabela 4 - Frequência relativa (%) de 34 isolados obtidos a partir de diferentes cultivares de tomateiro, de acordo com a parte vegetal da qual foi obtida a amostra para o isolamento..... 65
- Tabela 5 - Reação de Gram, produção de sideróforos e capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos de 34 isolados de bactérias endofíticas obtidos a partir de amostras de tomateiro..... 68
- Tabela 6 - Atividade antimicrobiana de 20 isolados de bactérias endofíticas contra *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) e/ou *X. gardneri* (Xg) após 72 horas de incubação*. A atividade antimicrobiana (mm) foi obtida pela diferença entre o diâmetro da zona de inibição e o diâmetro da colônia do isolado testado. 71
- Tabela 7 - Caracterização fenotípica dos 20 isolados selecionados devido à presença de atividade antimicrobiana frente aos patógenos *X. gardneri* e/ou *P. syringae* pv. *tomato*..... 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC - 1-aminociclopropano-1-carboxilato
AIA - ácido indol acético
AJ - ácido jasmônico
AS - ácido salicílico
ASM - Acibenzolar-S-metil
avr - avirulência (genes *avr*)
CAS – Cromo Azurol S
CMC - carboximetilcelulose
DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EPS – exopolissacarídeo (polissacarídeo extracelular)
ET - etileno
ERIC - enterobacterial repetitive intergenic consensus
ERO – espécies reativas de oxigênio
FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio
GABA - ácido gama-aminobutírico
IRS - indução de resistência sistêmica
NA – nutriente ágar
PAMPs - pathogen-associated molecular patterns
PCR - Polymerase Chain Reaction
PR - proteínas relacionadas à patogênese
Pst – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
R - resistência (genes R)
RSA - resistência sistêmica adquirida
RSI – resistência sistêmica induzida
REP - repetitive extragenic palindromic
RH - reação de hipersensibilidade
RPCPs - rizobactérias promotoras de crescimento de plantas
TSB - Trypticaseína de soja
UFC – unidades formadoras de colônia
Xg – *Xanthomonas gardneri*
YDC - Yeast Dextrose Carbonate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1 OBJETIVOS.....	27
1.1.1 Objetivo Geral	27
1.1.2 Objetivos Específicos	27
1.2 HIPÓTESE	28
2 REFERENCIAL TEÓRICO	29
2.1 A CULTURA DO TOMATEIRO	29
2.1.1 Produção e importância econômica	29
2.1.2 Grupos varietais e resistência a bacterioses	29
2.2 MANCHAS FOLIARES DO TOMATEIRO	30
2.2.1 A pinta bacteriana	31
2.2.2 A mancha bacteriana	33
2.2.3 Medidas de prevenção e controle de manchas foliares do tomateiro	35
2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	37
2.3.1 Definições e origem de bactérias endofíticas	37
2.3.2 Diversidade da comunidade bacteriana endofítica	38
2.4 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	41
2.4.1 Controle biológico de doenças vegetais	41
2.4.2 Indução de resistência sistêmica	43
2.4.3 Promoção do crescimento vegetal	45
2.4.4 Isolamento e diferenciação de isolados bacterianos	46
2.4.5 Seleção de bactérias benéficas à planta	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 MATERIAL VEGETAL	55

3.2 ISOLADOS PATOGÊNICOS E PRODUÇÃO DE INÓCULO	56
3.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE PLANTAS DE TOMATE DE DIFERENTES CULTIVARES	57
3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DOS ISOLADOS	59
3.4.1 Caracterização morfológica	59
3.4.2 Caracterização fenotípica	59
3.4.3 Diferenciação genotípica entre antagonistas pertencentes ao gênero <i>Pseudomonas</i>	61
3.5 ENSAIO DE ANTIBIOSE <i>IN VITRO</i>	61
3.6 BIOENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA	62
4 RESULTADOS.....	64
4.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	64
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS E DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA ENTRE ANTAGONISTAS	66
4.3 ENSAIO DE ANTIBIOSE <i>IN VITRO</i> E PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	70
4.4 BIOENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA	75
5 DISCUSSÃO.....	78
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE DIFERENTES ÓRGÃOS VEGETAIS E CULTIVARES DE TOMATEIRO.....	78
5.2 POTENCIAL DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	81

6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXO	106

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um dos produtos hortícolas mais consumidos no mundo, seja na forma processada ou in natura (BLANCARD, 2012; GAMBACORTA et al., 2005). Entretanto, está sujeito a diversos problemas fitossanitários, principalmente doenças de origem bacteriana. No Brasil, em regiões onde o clima quente e úmido favorece estas doenças, as perdas econômicas são elevadas e é muito difícil o seu controle. Por estes motivos, em geral, uma alta carga de agrotóxicos é utilizada durante a produção de tomate (HALFELD-VIEIRA, 2002).

As manchas-foliaves são doenças de grande importância em cultivos de tomate, apresentam sintomas característicos que reduzem a área fotossintética, diminuindo assim a produtividade (VORHOLT, 2012). Ocorrem em praticamente todas as áreas agrícolas em diversas partes do mundo e são mais frequentes e severas em regiões de clima quente e úmido (AGRIOS, 2005; KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). Ao todo sete espécies diferentes de bactérias podem ocasionar manchas com características similares, incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Clavibacter* (BLANCARD, 2012).

A pinta bacteriana é um tipo de mancha foliar causada por bactéria da espécie *P. syringae* pv. *tomato*. Além da perda de produtividade em decorrências da redução da área fotossintética, pode ocorrer a depreciação do produto final devido à presença de lesões nos frutos, tornando-os impróprios para o mercado de produtos frescos (WILSON et al., 2002). Os sintomas iniciais na folha caracterizam-se por manchas arredondadas de cor marrom-escura, contendo halos amarelados que podem variar de tamanho, textura e cor (CUPPELS; LOUWS; AINSWORTH, 2006).

Outro gênero de bactérias causadoras de manchas foliares em plantas de tomate é *Xanthomonas*. No Brasil, um estudo com bactérias deste gênero isoladas a partir de plantas sintomáticas de campos de produção de tomate industrial apontou uma maior prevalência da espécie *X. gardneri* em relação às demais na região Sudeste do Brasil. Esta fitobactéria coloniza preferencialmente folhas jovens em condições de alta umidade e temperatura (MARCUIZZO; BECKER; FERNANDES, 2009). Ocasiona manchas com tamanho de até 3 mm de diâmetro que podem apresentar halo amarelado (BLANCARD, 2012).

De acordo com Clemente e Boiteux (2012), o controle de doenças bacterianas é muito difícil e requer a adoção de medidas preventivas como o uso de genótipos resistentes. No caso da pinta bacteriana, as cultivares resistentes são empregadas como medida de controle da doença e estas

possuem o gene *Pto* que confere resistência a *P. syringae* pv. *tomato*. No Brasil, a maioria das cultivares de tomate para processamento industrial apresentam resistência a este patógeno (CLEMENTE; BOITEUX, 2012). Entretanto, no caso da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* sp., não há genótipos do tomateiro resistentes à doença e o tratamento químico é pouco efetivo (HERT et al., 2009).

Existem poucos produtos registrados para o controle químico de bacterioses e em geral, são muito utilizados a campo compostos à base de cobre (oxicloreto de cobre) (CLEMENTE; BOITEUX, 2012). Esses produtos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com fungicidas ditiocarbamatos como mancozeb para o controle da mancha bacteriana do tomate. Contudo, uma característica inerente a estes compostos é a alta toxicidade ao meio ambiente e pouca efetividade em condições ótimas para o desenvolvimento da doença (BYRNE et al., 2005; HERT et al., 2009; STROBEL; DAISY, 2003). Além disso, podem desencadear um processo de seleção de diversos fitopatógenos resistentes aos ingredientes ativos (MARTIN; HAMILTON; KOPITTKE, 2004).

Para que as bacterioses foliares ocorram, algumas condições são necessárias, como a presença de um filme de água sob a superfície das folhas que favorece a locomoção e entrada do patógeno por aberturas naturais como estômatos e hidatódios (AGRIOS, 2005). Além disso, de acordo com Dianese, Ji e Wilson (2003), estas bactérias patogênicas também necessitam colonizar o tecido vegetal das folhas, pois as manchas-foliares são doenças locais que afetam, num primeiro momento, apenas a área de infecção do patógeno (AGRIOS, 2005).

Contudo, existe uma abundante microbiota endofítica e presente na filosfera. Os micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior dos tecidos vegetais, sem ocasionar efeitos negativos à planta. Estes micro-organismos possuem potencial para atuar no controle de manchas-foliares, pois ocupam o mesmo habitat de muitas bactérias fitopatogênicas, caracterizando um mecanismo de controle biológico por competição por espaço e nutrientes (BARRA et al., 2008; HALFELD-VIEIRA et al., 2004; RYAN et al., 2008).

Os micro-organismos são uma fonte rica de metabólitos com atividade biológica (mais de 20.000 compostos ativos), a maioria destes provenientes de bactérias (BRADER et al., 2014). As bactérias endofíticas, por ocuparem um habitat mais específico no interior do tecido vegetal, estão menos propensas à exclusão devido alterações do ambiente externo (aumento da temperatura, escassez de umidade, irradiação UV). Por este motivo a sua sobrevivência é favorecida e há menor competição por nutrientes com outros micro-organismos (WEYENS et al., 2009).

Além da competição por espaço e nutriente, a atividade antagonista de bactérias pode afetar diretamente o patógeno devido à secreção de metabólitos ou lise celular (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014). A inibição de crescimento pode ocorrer devido à produção de compostos tóxicos ou por ocasionar modificações ambientais (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

Recentemente, uma classe de compostos químicos que vem sendo muito utilizada no controle de bacterioses de plantas é a de indutores de resistência como o composto Acibenzolar-S-metil (ASM). No entanto, os custos metabólicos para a aquisição de resistência são grandes por parte da planta e por esse motivo, após repetidas aplicações, o composto pode afetar de forma negativa o crescimento e produtividade do tomate (BYRNE et al., 2005).

Já foi comprovada a capacidade de diversas espécies de bactérias endofíticas e de bactérias que colonizam a rizosfera na ativação de mecanismos de proteção físicos e químicos da planta contra patógenos (SILVA et al., 2004; VAN LOON, 2007). A indução de resistência sistêmica (IRS) quando desencadeada por estes micro-organismos não apresenta os efeitos deletérios ao crescimento vegetal gerados por indutores químicos como o ASM. Ao contrário, considerando-se as rizobactérias, em muitos casos, há também associada à proteção vegetal, uma capacidade de promoção do crescimento (YI; YANG; RYU, 2013).

Nas últimas décadas, a preocupação com segurança alimentar e os riscos associados ao consumo frequente de alimentos contaminados tem estimulado diversas pesquisas na busca por alternativas tanto ao uso de agrotóxicos quanto ao uso de fertilizantes químicos (EMMERT J.; HANDELSMAN, 1999; GAMBACORTA et al., 2005).

Cada vez mais o uso de micro-organismos na agricultura tem se mostrado uma alternativa promissora para o incremento da produtividade e controle de fitopatógenos, sem os riscos ambientais inerentes à aplicação de compostos tóxicos. Os chamados biopesticidas e biofertilizantes utilizam micro-organismos em suas formulações, podendo conter em sua composição fungos, bactérias além de extratos e compostos fitoquímicos (BHARDWAJ et al., 2014). Estes produtos vêm ganhando mercado e o seu crescimento desde 2005 chega a 9,95% ao ano em contrapartida ao mercado de pesticidas sintéticos com decréscimo a uma taxa de 1,5% ao ano (CGEE, 2010).

Outra vantagem da aplicação de micro-organismos na agricultura está associada à diminuição no uso de fertilizantes com a diminuição dos custos de produção e a redução de poluentes devido ao uso de uma alternativa à aplicação de adubação química (DE MELO; DE AZEVEDO,

1998). Desse modo, o uso de micro-organismos capazes de solubilizar fosfatos representa uma alternativa aos fertilizantes fosfatados, cuja produção gera resíduos altamente poluentes ao meio ambiente (SHARMA et al., 2013).

Outras bactérias com potencial de uso agrícola são aquelas produtoras de sideróforos, moléculas que se ligam fortemente ao ferro. Uma consequência da associação destas bactérias com a planta é a melhoria nas condições nutricionais devido a uma maior disponibilidade de ferro para o vegetal. O ferro fica indisponível para os patógenos e, portanto, a produção de sideróforos apresenta um efeito protetor para a planta hospedeira (VERMA; GANGE, 2014). Além disso, os sideróforos também são capazes de ativar os mecanismos de defesa vegetal (AZNAR et al., 2014; MEZIANE et al., 2005; RAN et al., 2005; RYAN et al., 2008).

O estudo da microbiota associada à planta de tomateiro é necessário para aprofundar o conhecimento sobre esta comunidade microbiana e possibilitar o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas para estes micro-organismos, como por exemplo, o seu uso em formulações de biopesticidas e biofertilizantes (VORHOLT, 2012). Existem poucos estudos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças bacterianas, sobretudo para o biocontrole de doenças vegetais da parte aérea.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo isolar bactérias associadas às raízes, rizosfera, folhas, flores e sementes de diferentes genótipos de tomateiro e selecionar isolados para o controle da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* e da pinta bacteriana causada *P. syringae* pv. *tomato*. Para isto, foram isoladas e selecionadas bactérias de acordo com a potencialidade para a promoção do crescimento vegetal e controle biológico por meio de ensaios *in vitro* e bioensaios em casa de vegetação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar isolados bacterianos, obtidos a partir de plantas de tomateiro sadias de diferentes cultivares, no controle da mancha bacteriana causada por *X. gardneri*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias endofíticas a partir de amostras de sementes, folhas, flores e raízes de diferentes de cultivares de tomateiro;
- Caracterizar as bactérias isoladas quanto a produção de enzimas hidrolíticas (amilase e pectinase), sideróforos e capacidade de solubilização de fosfato inorgânico;
- Avaliar *in vitro* o potencial antibacteriano dos isolados *sobre X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato*;
- Diferenciar isolados utilizando tipagem molecular por meio de BOX-PCR;
- Avaliar a capacidade dos isolados para a redução da severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* por meio de bioensaios com plantas de tomateiro em condições de casa de vegetação;
- Selecionar dentre os isolados bacterianos obtidos, os agentes de controle biológico mais promissores;

1.2 HIPÓTESE

Os isolados bacterianos endofíticos obtidos a partir de amostras da parte aérea, sementes e raízes de plantas sadias de diferentes cultivares do tomateiro atuam no controle da mancha bacteriana causada por *X. gardneri*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DO TOMATEIRO

2.1.1 Produção e importância econômica

O tomate (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae, a qual inclui outras espécies de importância agrônômica como a berinjela, a batata, pimentão e tabaco (NAIKA et al., 2006). A produção de tomate para consumo *in natura* é importante fonte de renda para pequenos produtores, sobretudo para agricultura familiar, modelo que prevalece no estado de Santa Catarina.

Originário da parte ocidental da América do Sul, o tomate está entre as hortaliças de maior importância no mundo (PANTHEE; CHEN, 2010). O cultivo de tomateiro se dá pelo sistema de estaqueamento e necessita elevada demanda de mão-de-obra, seja pelos tratamentos culturais ou pelo trabalho na colheita, transporte e comércio do produto (PEREIRA-CARVALHO; LORENA; TOBAR, 2014). O ciclo de produção do tomate é curto e varia de 3-4 meses (BLANCARD, 2012).

Em 2006, a produção mundial de tomate chegou a 124 milhões de toneladas e o Brasil foi o 9º maior produtor, atrás de países como a China, Estados Unidos e Turquia (BLANCARD, 2012). A cultura do tomate representa 23% da produção brasileira de hortaliças (VILELA; HENZ, 2000).

Em Santa Catarina, a região do Alto Vale do Rio do Peixe que abrange os municípios de Caçador, Lebon Régis, Rio das Antas e Macieira, destaca-se como polo produtor de tomate, responsável por aproximadamente 49% da produção estadual (EPAGRI, 2014).

2.1.2 Grupos varietais e resistência a bacterioses

No início da década de 1940, a cultivar ‘Santa Cruz’, foi o primeiro grupo varietal de tomate desenvolvido no Brasil (PEREIRA-CARVALHO; LORENA; TOBAR, 2014). Hoje em dia, além do grupo ‘Santa Cruz’, há produção de grupos varietais do tipo ‘Salada’, ‘Italiano/Saladete’ e ‘Cereja/Grape’. O aumento na produção desde a década de 1980 foi atribuído à adoção de híbridos resistentes e, de acordo com Karpouzias e colaboradores (2011), diversos genótipos de tomateiros podem ser classificados como resistentes à incidência de determinadas espécies de bactérias.

Ao longo do processo de melhoramento genético vegetal, algumas características do tomateiro foram alteradas visando conferir maior resistência a determinadas doenças como a diminuição do número de estômatos por unidade de área foliar, alterações de propriedades da superfície foliar e na sinalização hormonal via ácido jasmônico ou GABA (ácido gama-aminobutírico) (VORHOLT, 2012).

Após ser infectada por determinado patógeno, a planta utiliza substâncias químicas pré-existentes e suas combinações para formar estruturas de defesa e ou compostos de defesa, como fitoalexinas e outros compostos com ação antimicrobiana. Estes mecanismos compõem a resistência poligênica, geral ou quantitativa pois depende da presença de vários genes (resistência horizontal, multigênica parcial) (TUZUN, 2001). A resistência poligênica pode estar presente em diferentes níveis contra diferentes patógenos. A resistência de uma cultivar é dependente da concentração constitutiva e rapidez no acúmulo proteínas relacionadas à patogênese (PR) (AGRIOS, 2005).

As plantas em geral apresentam alguns genes relacionados à resistência (genes *R*) já o patógeno apresenta o gene de avirulência (*avr*) para cada gene *R* da planta. Quando a planta é atacada por patógeno biotrófico, a resistência é desencadeada devido à presença de pares de genes relacionados à doença tanto na planta, quanto no patógeno (AGRIOS, 2005). Este tipo de resistência é chamada raça-específica, resposta de hipersensibilidade, gene *R* ou resistência vertical (TUZUN, 2001).

2.2 MANCHAS FOLIARES DO TOMATEIRO

As folhas são os órgãos vegetais responsáveis pelo processo fotossintético das plantas e desempenham papel crucial no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). As doenças foliares ocorrem em praticamente todas as áreas agrícolas em diversas partes do mundo, contudo, são mais frequentes e severas em regiões de clima quente e úmido (AGRIOS, 2005).

À medida que a doença evolui, outras partes do vegetal são afetadas: caule, pecíolo e flores (JI et al., 2006). Além de diminuir a área fotossintética e influenciar diretamente no crescimento vegetal, a doença acarreta diminuição no rendimento e perda na qualidade do produto (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). No fruto, pode ocasionar alguns sintomas típicos como lesões escamosas e danos devido à exposição excessiva ao sol, que ocorre devido à perda de folhas da planta (BYRNE et al., 2005).

Ao todo, sete espécies diferentes de bactérias podem ocasionar manchas com características similares, destacando as espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Clavibacter* (BLANCARD, 2012). Estas bactérias são em geral, bastonetes, aeróbios não formadores de esporos de resistência (AGRIOS, 2005).

Uma característica comum aos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas* é a presença de flagelo polar (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). Esta característica contribui significativamente para o processo infeccioso ao permitir a locomoção da bactéria sob a superfície foliar à procura de uma abertura natural. A presença de um filme de água sob a superfície das folhas favorece a locomoção e entrada do patógeno por aberturas naturais (estômatos e hidatódio) (AGRIOS, 2005).

Para defender-se do ataque destes patógenos a planta depende de respostas imunes inatas que são responsáveis por barrar a entrada e limitar a infecção. Estas respostas são desencadeadas por padrões moleculares conservados nos patógenos, denominados PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Estes padrões são conservados pois estão associados à sua sobrevivência e infectividade. Como exemplo de PAMPs de origem bacteriana pode-se citar as flagelinas, lipopolissacarídeos, proteínas de choque frio, peptidoglicanas e fatores de alongação (BHATTARAI et al., 2016).

2.2.1 A pinta bacteriana

O gênero *Pseudomonas* é composto por bactérias em forma de bastonetes aeróbios com múltiplos flagelos (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). Este gênero possui diversas espécies de bactérias fitopatogênicas que podem ocasionar sintomas variados na planta, desde a formação de pequenas manchas foliares até a formação de galhas e tumores (SCHAAD; JONES; CHUN, 2000). O gênero *Pseudomonas* caracteriza-se por apresentar grande variedade fenotípica e genotípica (BLAKEMAN; WILLIAMSON, 1994).

P. syringae é o agente causal da pinta bacteriana, também conhecida como mancha bacteriana pequena. Considerado um patógeno hemi-biotrófico, pode ser dividido em aproximadamente 50 patovares de acordo com a especificidade com o hospedeiro (XIN; HE, 2013). Em geral, estas bactérias podem sobreviver por períodos curtos no solo e por períodos maiores em restos vegetais (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). As sementes podem ser fonte de inóculo, e desta forma, a bactéria pode sobreviver por longos períodos (mais de 10 anos) (BLANCARD, 2012).

Durante seu ciclo de vida, o patógeno pode sobreviver como epífita ou infectar várias solanáceas cultivadas, ervas daninhas e plantas silvestres (RYAN et al., 2011). O tamanho da população epifítica influencia na patogenicidade da bactéria (BAKER et al., 2010).

De acordo com Blakeman & Williamson (1994), diversos estudos com a epidemiologia de doenças foliares demonstraram que o patógeno pode se multiplicar na superfície de plantas saudáveis e produzir inóculo, mesmo na ausência de doença. No caso de *P. syringae*, existem muitos casos de isolamento da bactéria patogênica a partir da superfície de plantas saudáveis, incluindo *P. syringae* pv. *tomato*, que infecta o tomateiro (SMITLEY; MCCARTER, 1982).

O progresso da pinta bacteriana é favorecido por condições de alta umidade e temperaturas amenas, entre 15 e 25°C (JI et al., 2006; PEDLEY; MARTIN, 2003). No processo de infecção do tomateiro, primeiramente *P. syringae* pv. *tomato* coloniza a filosfera (fase residente) e em seguida passa para uma fase endofítica (HIRANO; UPPER, 2000). A fitobactéria coloniza os tecidos do parênquima e multiplica-se nos espaços intercelulares. Secreta enzimas e toxinas que destroem a lamela média e parede celular para obtenção de nutrientes a partir dos tecidos vegetais decompostos (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995).

Os sintomas iniciais caracterizam-se pelo aparecimento de pequenos pontos translúcidos, de aspecto encharcado devido ao extravasamento do conteúdo celular (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). Posteriormente, há ocorrência de necrose na região central da mancha e esta é colonizada por micro-organismos saprofíticos (AGRIOS, 2005). As manchas são pequenas (1 mm) e de coloração que varia de preto a marrom (Figura 1). Também podem aparecer lesões nos frutos imaturos e maduros, depreciando o seu valor de mercado (PEDLEY; MARTIN, 2003).

As manchas necróticas podem coalescer e abranger grandes áreas (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). Estas manchas podem estar circundadas por halo clorótico e o amarelecimento ocorre pela degradação da clorofila devido à ação da fitotoxina coronatina. A coronatina produzida pela bactéria também é capaz de suprimir o fechamento dos estômatos, um mecanismo de defesa vegetal (BAKER et al., 2010; PEDLEY; MARTIN, 2003; VORHOLT, 2012).

Figura 1-Sintomas típicos da pinta bacteriana causada por *P. syringae* pv. *tomato* em folhas de tomateiro.



Fonte: Gerald Holmes (California Polytechnic State University at San Luis Obispo). Disponível em: <http://www.invasive.org>. Acesso em: 16 jan. 2017.

Nos primeiros estágios do desenvolvimento vegetal, a doença pode acarretar a morte da planta (KIMATI; FILHO; AMORIM, 1995). Ao ser infectada, a planta responde a estímulos gerados por interações a nível molecular. No caso de *P. syringae* pv. *tomato*, tais interações resultam na produção de antocianinas, acúmulo de alcaloides, aumento na liberação de etileno e inibição do crescimento radicular (BAKER et al., 2010).

2.2.2 A mancha bacteriana

O gênero *Xanthomonas* é composto por bactérias Gram-negativas que em meio extrato de levedura-dextrose-carbono (YDC) formam colônias convexas, arredondadas, mucóide e de coloração amarela (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). Suas células são revestidas por exopolissacarídeo EPS (goma xantana) e os pigmentos amarelados que produzem são insolúveis em água e denominados xanthomonadinas (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

De acordo com Jones et al. (2004), são quatro espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas* que podem ocasionar manchas-foliares no tomateiro, pimentão ou em ambos: *X. euvesicatoria* (grupo A), *X. vesicatoria* (grupo B), *X. perforans* (grupo C) e *X. gardneri* (grupo D) (POTNIS et al., 2011). As cepas dos grupos A e B são globalmente distribuídas. As do grupo C ocorrem no México, Tailândia e os EUA, as

do Grupo D nos EUA, Brasil, Costa Rica, e Iugoslávia tomate (JONES et al., 2000).

X. gardneri é uma espécie com diversas raças, esta fitobactéria foi primeiramente isolada na antiga Iugoslávia a partir de plantas de tomate sintomáticas e denominada como *P. gardneri* (CÂNDIDO et al., 2008). Penetra no interior do tecido vegetal de plantas de tomates através de aberturas naturais como estômatos e hidatódios (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). Coloniza os espaços intercelulares e ocasiona morte celular rapidamente por ação de diversas enzimas como pectinases, proteases, amilases e lipases, para fornecer nutrientes à bactéria (BLANCARD, 2012).

A bactéria coloniza folhas jovens em condições de grande umidade e temperatura variando entre 20 e 30°C (MARCUIZZO; BECKER; FERNANDES, 2009). Ocasiona manchas pequenas, de forma circular ou ligeiramente angular e de aspecto úmido (Figura 2), que se tornam marrom ou preta com tamanho de até 3 mm de diâmetro e podem apresentar halo amarelado (BLANCARD, 2012). Posteriormente, as manchas podem tornar-se necróticas e em alguns casos, folhas inteiras ficam amareladas.

Figura 2 - Sintomas típicos da mancha bacteriana causada por *X. gardneri* em folhas de tomateiro. A) sintomas iniciais que aparecem a partir dos 7 dias após a infecção; B) sintomas de manchas circulares com halos amarelados após 14 dias da infecção.



2.2.3 Medidas de prevenção e controle de manchas foliares do tomateiro

Os mecanismos de resistência às doenças em plantas são frequentemente ativados por interações gene-a-gene. A reposta é controlada por seu material genético e também por genes do próprio patógeno (ROMMENS et al., 1995). No tomate o gene *Pto* confere este tipo de resistência a *P. syringae* pv. *tomato*. Estudos revelaram que a base molecular do reconhecimento gene-a-gene neste patossistema está relacionado a interações entre uma proteína quinase presente no citoplasma da célula do hospedeiro vegetal e duas proteínas efetoras de *Pseudomonas* sp., *AvrPto* e *AvrPtoB* (PEDLEY; MARTIN, 2003).

O uso de genótipos resistentes é uma medida preventiva amplamente indicada para o controle de diversas bacterioses foliares como é o caso da pinta bacteriana. No Brasil, grande parte das cultivares de tomate para processamento industrial apresentam o gene *Pto* (CLEMENTE; BOITEUX, 2012). No entanto, esta medida somente é efetiva para o controle da raça 0 do patógeno (JI et al., 2006).

No caso da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* sp., não há genótipos de tomateiro resistentes à doença (HERT et al., 2009). De acordo com Bhattarai et al. (2016), dentre os desafios a serem superados para o desenvolvimento de resistência genética duradoura contra *Xanthomonas* sp. estão a sua natureza multigênica e a disponibilidade limitada de genes de resistência do tomateiro.

Algumas práticas culturais que podem ser utilizadas no controle de bacterioses foliares são a rotação de culturas, o uso de sementes saudáveis certificadas, o descarte adequado de restos vegetais infectados (BYRNE et al., 2005). No entanto, quando em condições favoráveis à doença e sobre forte pressão de inóculo, práticas culturais não proporcionam um bom controle de doenças bacterianas, motivo pelo qual segundo Ji et al. (2006), são pouco adotadas por produtores comerciais.

Existem poucos produtos registrados para o controle químico de bacterioses (CLEMENTE; BOITEUX, 2012). A forma mais utilizada para o controle destas doenças ainda é a aplicação de compostos bactericidas a base de cobre, como o oxiclreto de cobre. Esses produtos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com fungicidas ditiocarbamatos como o mancozeb para o controle da mancha bacteriana do tomate (BYRNE et al., 2005).

Outra forma de controle, que ultimamente vem caindo em desuso é a aplicação de antibióticos como a estreptomina. Esta prática muito utilizada no passado está sendo substituída pelo uso de compostos a base de cobre. No entanto, há relatos da baixa eficiência tanto de antibióticos quanto dos compostos à base de cobre (QUEZADO-DUVAL et al., 2003).

Esta baixa eficiência pode estar relacionada ao aumento da quantidade de isolados resistentes aos seus princípios ativos. Quezado-Duval et al. (2003) em um estudo com isolados de *Xanthomonas* spp. obtidas a partir de plantas doentes em campos comerciais de tomate para processamento industrial nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e Bahia, verificaram a prevalência de isolados de *X. gardneri*, resistentes à estreptomina (25 µg/ml) (98% dos isolados) e ao cobre (48% dos isolados).

Acibenzolar-S-metil (ASM) é um composto sintético do grupo benzotriazol e é análogo funcional do ácido salicílico. Esta classe de compostos químicos também vem sendo muito utilizada no controle de bacterioses e é classificada como indutor de resistência (BYRNE et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006). Diversos estudos mostraram a eficácia deste composto na redução da severidade de bacterioses no tomateiro (ANDRADE et al., 2013; SOYLU; SOYLU; BAYSAL, 2003),

sobretudo da mancha bacteriana causada por espécies do gênero *Xanthomonas* (CAVALCANTI et al., 2006).

2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

2.3.1 Definições e origem de bactérias endofíticas

Existem diversas formas de interações entre bactérias e plantas, como patógenos, simbioses, epifíticas e endofíticas. De acordo com Verma & Gange (2014), destas associações a endofítica é a menos estudada e compreendida. Os termos endofítico e epifítico descrevem o local onde estes micro-organismos podem ser encontrados em associação com plantas, internos ou externos ao tecido, respectivamente (HALLMANN et al., 1997).

O conceito clássico de endófito refere-se à microbiota composta principalmente por fungos e bactérias capazes de colonizar os espaços intercelulares, sistema vascular ou o meio intracelular (BOTTA et al., 2013; ZINNIEL et al., 2002). Esta associação é discreta e aparentemente não apresenta efeito deletério para o hospedeiro (BOTTA et al., 2013; SILVA; BETTIOL; TERRASAN, 2006).

Entretanto, devido aos avanços nas técnicas moleculares, o conceito de endófito foi ampliado pela possibilidade de sequenciamento do genoma de endófitos não-cultiváveis. Estes micro-organismos podem ser identificados, porém não isolados (GAIERO et al., 2013). Um conceito mais amplo foi elaborado por Bulgarelli et al. (2012), e considera como endófito o conjunto de genomas microbianos localizado internamente aos tecidos vegetais.

De acordo com Ryan et al. (2008), a maioria das plantas estudadas possui ao menos um micro-organismo endofítico. No entanto, pouco se sabe sobre a importância ecológica e agrônômica de micro-organismos endofíticos associados a diferentes espécies vegetais, bem como a sua origem (LAMBERS; III; PONS, 2013).

Grande parte dos micro-organismos presentes na planta origina-se do solo e penetra na planta por ferimentos nas raízes ou através dos pêlos radiculares (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; UPRETI; THOMAS, 2015). Mais precisamente, estas bactérias entram na planta durante a germinação através da radícula, raízes secundárias, estômatos ou através de ferimentos nas folhas (VERMA; GANGE, 2014; ZINNIEL et al., 2002).

Estes micro-organismos podem colonizar diversos órgãos vegetais e são transportados via sistema vascular (HALLMANN et al., 1997) ou

pelo apoplasto (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). São classificados de acordo o principal habitat que ocupam. Endofíticos facultativos ou oportunistas são aqueles que eventualmente invadem e colonizam os tecidos vegetais. Conseguem sobreviver em algum estágio do seu ciclo de vida fora do tecido vegetal (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008).

Algumas cepas de bactérias que habitam a rizosfera são consideradas endofíticas facultativas ou oportunistas. Estas rizobactérias colonizam as raízes acidentalmente através de ferimentos e por isso podem ser menos competentes quanto à colonização do tecido vegetal (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008). No entanto, por serem originadas de um ambiente altamente competitivo, possuem um grande arsenal de metabólitos que podem estar envolvidos tanto na defesa vegetal quanto na interação com a planta (BRADER et al., 2014).

De acordo com Baldani et al. (1997), endofíticos facultativos como as bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* presentes na rizosfera possuem um enorme potencial. A habilidade de colonizar tanto a superfície quanto o interior dos tecidos vegetais é uma vantagem, sobretudo no caso de uma associação destas bactérias fixadoras de nitrogênio com plantas não leguminosas (BALDANI et al., 1997).

Já os endofíticos verdadeiros ou obrigatórios vivem estritamente em associação e estão altamente adaptados ao hospedeiro vegetal (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009). Seu crescimento, sobrevivência e transmissão para outras plantas ocorre verticalmente ou através de vetores (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008). De acordo com Brader et al. (2014), a adaptação de bactérias endofíticas aos tecidos vegetais propiciou ao longo da evolução a capacidade de sintetizar metabólitos específicos que suportam ou são necessários à interação com o hospedeiro.

2.3.2 Diversidade da comunidade bacteriana endofítica

Existem diversos gêneros de bactérias endofíticas que são conhecidos devido à capacidade de associar-se a diversas espécies de plantas e frequentemente são isoladas em estudos para a seleção de antagonistas. Nesta lista incluem-se: *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Microbacterium* (VERMA; GANGE, 2014).

Diversos fatores interferem na composição da comunidade microbiana associada às plantas, sobretudo em um ambiente agrícola

(FELIX; NORONHA; MILLER, 2014). De acordo com Zinniel et al. (2002), variações na população bacteriana já foram atribuídas à origem, idade e espécie vegetal, tempo de amostragem e condições ambientais.

Sabe-se que cada espécie vegetal pode abrigar uma determinada microbiota e que esta responde de forma dinâmica a estímulos ambientais. Tan et al. (2006) verificaram que a composição da população de actinobactérias endofíticas do gênero *Streptomyces* varia de acordo com a cultivar de tomateiro, estado fisiológico e tipo de solo.

A presença de patógenos também influencia na comunidade microbiana endofítica. De acordo com Podolich et al. (2014), a comunidade microbiana endofítica inata pode ser recrutada pela planta sob ataque de patógenos.

Correa et al. (2007) avaliaram o perfil da comunidade nativa de bactérias associadas às raízes e folhas de duas cultivares de plantas de tomate tratadas com a cepa bacteriana promotora de crescimento *Azospirillum brasilense*. Neste estudo foi possível verificar que o genótipo do tomateiro influencia na resposta da comunidade bacteriana a inoculação de *A. brasilense* (CORREA et al., 2007). Além disso, foi possível verificar que a presença de inoculantes também influencia a comunidade endofítica bacteriana.

Existem diversas maneiras de estudar a microbiota associada ao tecido vegetal, seja por meio do isolamento ou de métodos independentes de cultivo (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009). De acordo com Verma & Gange (2014) diversos estudos com bactérias endofíticas tem demonstrado que o uso de técnicas de *fingerprint* e análise de clones tem provido informações adicionais para o estudo da composição da comunidade endofítica.

Por meio de análises filogenéticas da comunidade bacteriana endofítica das folhas de tomateiro, Romero; Marina e Pieckenstains (2014) verificaram que esta compartilha similaridades com a de endofíticos presentes na rizosfera. Os micro-organismos presentes na superfície vegetal (epifíticos) também são bastante diversos e a comunidade varia principalmente de acordo com sua localização na planta. *P. syringae* e *Erwinia (Pantoea)* spp. são bactérias frequentemente isoladas a partir da superfície foliar de diversas espécies vegetais (LINDOW; BRANDL, 2003). A parte área das plantas é dominada por folhas e estima-se que em sua superfície estão presentes 10^6 - 10^7 bactérias por cm^2 de área superficial (VORHOLT, 2012).

Estudos moleculares sobre as comunidades presentes na filosfera têm demonstrado que esta é composta por alguns filos dominantes e outros subgrupos. É alta a riqueza de espécies na filosfera, no entanto o

filo Proteobacteria, classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria predominam (VORHOLT, 2012).

A filosfera compreende a região externa das partes das plantas que ficam acima da superfície do solo e inclui as folhas, caules, flores e frutos (WEYENS et al., 2009). Considerado um ambiente de alta complexidade, a filosfera apresenta grandes variações de temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes (ANDREWS; HARRIS, 2000). O metabolismo dos micro-organismos presentes na superfície foliar é influenciado diretamente pelas condições ambientais e indiretamente pelo metabolismo da planta (VORHOLT, 2012).

Em geral, os micro-organismos isolados a partir da superfície foliar são oligotróficos (isolados em meio contendo de 1 a 10 mg de carbono solúvel por litro) sobrevivem a baixa diversidade, escassez e flutuação nas quantidades de nutrientes. Também são micro-organismos mais resistentes ao dessecamento e à luz UV. Há uma maior prevalência de micro-organismos produtores de pigmentação na superfície das folhas em comparação com os micro-organismos encontrados na rizosfera. Esta característica é atribuída à influência da radiação nas folhas (ANDREWS; HARRIS, 2000).

Os principais sítios de colonização destes micro-organismos são as junções de parede celular na epiderme, estrias, estômato e base de tricomas. Também estão presentes em depressões da cutícula e próximo a hidatódios. Em geral são encontradas bactérias em maior número na parte abaxial do que na adaxial devido à presença de estômatos e tricomas em maior número nestas regiões (WHIPPS et al., 2008).

Segundo Whipps et al. (2008), os micro-organismos epifíticos e endofíticos da filosfera formam um *continuum*. Contudo, quando epífitos penetram no apoplasto são chamados de endófitos e podem desencadear uma série de respostas de defesa da planta. Estas respostas podem ser diferenciadas de acordo o micro-organismo e são inespecíficas, afetando inclusive as populações epifíticas. Os micro-organismos patogênicos são capazes de sobreviver a tais respostas, contra-atacando ao manipular o hospedeiro após a transferência de efetores (VORHOLT, 2012).

A microbiota associada à rizosfera já foi amplamente estudada em comparação com a presente nas demais partes vegetais. A rizosfera é um ambiente com alta atividade microbiana (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). O ambiente rizosférico apresenta alta disponibilidade de nutrientes para a microbiota associada. Esta microbiota sofre influência direta dos exsudados liberados pela planta, o que faz da rizosfera um ambiente com alta competição e elevada diversidade de micro-organismos (VAN LOON, 2007).

Micro-organismos originários do solo podem colonizar a rizosfera e o rizoplano, penetrar na planta e estabelecer populações endofíticas que variam em quantidade de 10^5 a 10^7 UFC g^{-1} de peso fresco. Em geral, há maior probabilidade destes micro-organismos endofíticos apresentarem efeitos na promoção do crescimento de plantas do que apenas bactérias que colonizam a rizosfera (DAWWAM et al., 2013).

De acordo com Hardoim et al. (2012), a disseminação de bactérias endofíticas em sementes pode ser considerado um evento atípico e muito difícil de ser demonstrado. Existem diversas evidências que os micro-organismos das sementes e rizosfera podem tornar-se endofíticos e internalizar-se durante o crescimento das raízes (VORHOLT, 2012). A presença destes micro-organismos é evidenciada pela colonização das raízes recém-formadas (HALLMANN et al., 1997). Ferreira et al. (2008) demonstraram a colonização de mudas de eucalipto por *Pantoea agglomerans* originada das sementes.

A presença de micro-organismos na semente é altamente influenciada pelas condições e o tempo de armazenamento destas. Em estudos com o isolamento de micro-organismos a partir de sementes, verificou-se a baixa densidade bacteriana, em torno de 10 a 10^5 UFC/g (HALLMANN et al., 1997). Hardoim et al. (2012) estudaram a comunidade endofítica bacteriana de sementes de arroz. Por meio da técnica de PCR-DGGE, investigaram fatores bióticos e abióticos que influenciam na estrutura da comunidade bacteriana em plantas mantidas em condições de casa de vegetação. Neste estudo, diversos membros da comunidade bacteriana isolados a partir das sementes também foram detectados na rizosfera e no solo em torno das plantas.

2.4 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

2.4.1 Controle biológico de doenças vegetais

De acordo com Agrios (2005), controle biológico é a inibição total, parcial ou a destruição de uma população de patógenos por outro organismo. É um fenômeno natural que ocorre na maioria dos ambientes e parte do princípio de que são raros os casos de doenças. Em geral, o que existe é um equilíbrio nas relações ecológicas devido à presença de antagonistas que são responsáveis pelo controle populacional de patógenos (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

Sabe-se que grande parte dos micro-organismos simbióticos evoluíram com suas respectivas plantas hospedeiras, adaptando-se e

desenvolvendo mecanismos de proteção contra patógenos (VERMA; GANGE, 2014). Neste sentido, os endófitos beneficiam-se da proteção pelo vegetal contra fatores abióticos estressantes como a incidência de raios ultravioleta e mudanças bruscas de temperatura. Além disso, o tecido vegetal também fornece proteção contra fatores bióticos, pois delimitam o habitat de endófitos, restringindo a competição com micro-organismos epifíticos, por exemplo. (HALFELD-VIEIRA et al., 2004; SILVA; BETTIOL; TERRASAN, 2006).

O controle biológico de patógenos fúngicos pode ocorrer de diversas maneiras (ROMEIRO, 2005). De acordo com De Melo e De Azevedo (1998), os compostos voláteis produzidos por micro-organismos antagonistas podem inibir o crescimento micelial e a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, diminuindo a sua sobrevivência no ambiente.

As substâncias voláteis consideradas como mecanismos de antagonismo entre micro-organismos podem ser álcoois, aldeídos, cetonas e sulfetos (DUFFY; SCHOUTEN; RAAIJMAKERS, 2003). Muitas bactérias também são capazes de produzir enzimas hidrolíticas como quitinases, e este também é um mecanismo para biocontrole de patógenos devido à degradação da parede celular de fungos (WEYENS et al., 2009).

Em um caso específico, o controle de doenças fúngicas, de acordo por Minerdi et al. (2008), pode ser obtido por meio da associação entre bactérias simbióticas e uma cepa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* WT MSA 35. A cepa do fungo foi isolada a partir de solo supressivo na Itália. Verificou-se que a presença de um consórcio de bactérias dos gêneros *Serratia*, *Achromobacter*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas* que colonizavam a parte externa das hifas, impedia o fungo de causar doença. Além disso, este mesmo fungo atuava como antagonista e era responsável pelo controle de outras cepas de *F. oxysporum* patogênicas (MINERDI et al., 2008).

O controle de fitobactérias pode ocorrer diretamente pela produção e liberação de compostos bactericidas e representa um mecanismo de controle biológico eficaz devido à inibição do crescimento de patógenos bacterianos (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009; WEYENS et al., 2009). Além disso, determinados gêneros de bactérias são tidos como fonte de compostos com ação antibiótica para uso na medicina humana como uma estratégia alternativa para solução do problema gerado pelo surgimento de bactérias multirresistentes (COMPANT et al., 2005).

A produção de surfactinas, associada à capacidade de formação do biofilme bacteriano, já foi estudada como uma estratégia adotada por um

isolado de *Bacillus subtilis* obtido da rizosfera para facilitar o biocontrole de *P. syringae* em plantas de *Arabidopsis* (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004).

Outro mecanismo de biocontrole relacionado aos microrganismos obtidos da rizosfera é a competição a nutrientes. Esta competição em alguns casos também pode beneficiar a planta devido a uma maior disponibilidade de nutrientes e, no caso do ferro, pode ser mediada por sideróforos (WEYENS et al., 2009).

Em condições de escassez de ferro, grande parte de micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos é capaz de produzir moléculas de baixo peso molecular que se ligam ao ferro com uma alta afinidade, os sideróforos (BAKKER; PIETERSE; VAN LOON, 2007).

A produção desta molécula por bactérias associadas às raízes propicia uma maior disponibilidade de ferro para as plantas. No solo, o ferro torna-se indisponível para os patógenos, impedindo a sua multiplicação, caracterizando um mecanismo de controle biológico devido à competição por nutrientes (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). Além disso, a produção de sideróforos pode ser considerada um indicativo tanto da capacidade de controle biológico devido à competição por nutrientes, quanto por indução de resistência, visto que os sideróforos são moléculas elicitoras e ativam as defesas da planta contra patógenos (AZNAR et al., 2014).

2.4.2 Indução de resistência sistêmica

Outra forma de controlar doenças promovida por micro-organismos é pela indução de resistência, uma ferramenta para o manejo de doenças amplamente aceita, que baseia-se na ativação de mecanismos de defesa da própria planta (YI; YANG; RYU, 2013). As respostas de defesa vegetal podem ser através de barreiras físicas ou secreção de compostos antimicrobianos. Estes mecanismos de defesa apresentam amplo espectro de ação contra patógenos (ADAM; HEUER; HALLMANN, 2014) e apresentam efeito de longa duração (YI; YANG; RYU, 2013).

Existem basicamente dois tipos de indução de resistência: a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI). A RAS é mediada por processo dependente do ácido salicílico (AS). (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). Após uma resposta local, pode ocorrer o estabelecimento de uma resposta imune secundária sistêmica (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

O efeito da indução pode se dar não apenas pela ativação direta dos mecanismos de defesa vegetal, mas também pelo efeito “*priming*” nas células, o que resulta em uma resposta de defesa mais rápida e intensa após o primeiro contato com o patógeno (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013; YI; YANG; RYU, 2013). A resposta ocorre por meio de elicitores, moléculas de origem microbiana que pertencem a diversas classes químicas e são capazes de ativar os mecanismos de defesa vegetal (BURKETOVA et al., 2015).

De acordo com Burketová et al. (2015), diversos elicitores de origem bacteriana podem desencadear o processo de indução de resistência contra patógenos foliares. Dentre eles pode-se citar o antígeno-O, lipopolissacarídeo presente na membrana externa de *P. fluorescens* e *P. putida* (MEZIANE et al., 2005); EPS produzidos por bactérias ácido-láticas (BLAINSKI et al., 2017), deferoxamina, sideróforos produzidos por *Streptomyces pilosus* (AZNAR et al., 2014); acetoina, hidrocarboneto de baixo peso molecular produzido por rizobactérias do gênero *Bacillus* (RUDRAPPA et al., 2010).

As vias de sinalização dependentes do ácido salicílico estimulam a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e estão relacionadas a uma série de patógenos fúngicos, bacterianos e virais. A sinalização também pode ser dependente da produção de etileno (ET) e/ou ácido jasmônico (JA). No entanto, as três vias interagem bastante, sendo que a sinalização via AS pode inibir a AJ e vice-versa. (GLAZEBROOK, 2005).

O reconhecimento de determinados efetores de virulência desencadeia o processo de resistência pela ativação de genes-R e frequentemente resulta na rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estes compostos desencadeiam a próxima resposta de defesa que consiste na chamada hipersensibilidade ou reação de hipersensibilidade (RH) (GLAZEBROOK, 2005).

Os patógenos vegetais podem ser biotróficos e obter nutrientes a partir de tecidos vivos ou necrotróficos e ocasionar a morte celular do tecido vegetal. As respostas de defesa vegetal estão adaptadas ao ataque dos patógenos biotróficos por sinalização dependente de AS e dos patógenos necrotróficos por vias dependentes de ET e AJ. Alguns patógenos podem ser adaptados tanto ao estilo de vida biotrófico quanto ao necrotrófico e são denominados hemi-biotróficos. É o caso de *P. syringae* pv. *tomato*, visto que o estágio biotrófico inicia a infecção (GLAZEBROOK, 2005).

Dentre as bactérias associadas às plantas que podem acionar os mecanismos de defesa vegetal encontram-se as rizobactérias promotoras

de crescimento de plantas (RPCPs). Estas bactérias, assim como as bactérias endofíticas, podem desencadear a IRS que é mediada pelo ácido jasmônico e etileno (YI; YANG; RYU, 2013).

2.4.3 Promoção do crescimento vegetal

Diversos estudos com RPCPs demonstraram o enorme potencial destas bactérias tanto para a melhoria das condições nutricionais de plantas quanto para o controle de doenças vegetais (COMPANT et al., 2005; DAWWAM et al., 2013; GUO et al., 2004). Já foi demonstrado que além de promover o crescimento, são capazes de aumentar a produtividade e reduzir estresse biótico e abiótico das plantas (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

Barretti et al. (2008) verificaram a ação de bactérias endofíticas promotoras de crescimento no aumento da capacidade de absorção e da disponibilização de nutrientes, água e minerais pela planta. As bactérias do gênero *Micrococcus* e *Brevundimonas* isoladas a partir de plantas saudáveis de tomateiro apresentaram efeito positivo na absorção de nutrientes, aumentando a eficiência nutricional da planta.

O nitrogênio é um nutriente essencial para a planta e diversos micro-organismos como bactérias e actinobactérias auxiliam a planta na fase de crescimento, pois são capazes de fixar nitrogênio. Estes micro-organismos associam-se às plantas e realizam o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (DE MELO; DE AZEVEDO, 1998).

Cerca de 80% do nitrogênio proveniente da fixação biológica vem da associação entre plantas leguminosas e espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (GRAHAM; VANCE, 2000). No entanto, outros micro-organismos simbiotes também são capazes de fixar N₂, podem ser endofíticos e segundo Baldani, Goe e Döbereiner (1997) colonizar o interior das raízes e estarem presentes na parte aérea.

O fósforo, logo após o nitrogênio, é um dos nutrientes essenciais ao crescimento vegetal. Muitas vezes o fósforo presente no solo está na forma insolúvel e, portanto, encontra-se indisponível para as plantas. Para suprir as deficiências de fósforo do solo, é necessária a adição de fertilizantes fosfatados, aumentando assim os custos da produção (SHARMA et al., 2013). Além disso, 75% da quantidade de fertilizantes fosfatados aplicados no solo é rapidamente imobilizado e torna-se indisponível para a planta (WEYENS et al., 2009)

Os micro-organismos que solubilizam fosfatos fazem parte do ciclo do fósforo, convertendo a sua forma inorgânica e orgânica e

facilitando assim a aquisição deste nutriente pelas raízes da planta (SHARMA et al., 2013). Estes micro-organismos são mais comuns na rizosfera e solubilizam fosfatos devido à secreção de ácidos orgânicos como o ácido glucônico ou secreção de fosfatases extracelulares (WEYENS et al., 2009). A capacidade de solubilização de fosfatos já foi estudada em bactérias de diversos gêneros como: *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Achrobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (NAIK et al., 2008).

2.4.4 Isolamento e diferenciação de isolados bacterianos

Existem diversas técnicas de isolamento de micro-organismos que podem ser empregadas visando obter agentes de biocontrole eficazes para o controle de diversas doenças vegetais. A técnica utilizada pode variar de acordo com o tipo de amostra selecionada para o isolamento (VERMA; GANGE, 2014).

Dentre os diversos tipos de amostras utilizadas para o isolamento de micro-organismos benéficos à planta estão: amostras de solo (KAVITHA; UMESHA, 2007), da rizosfera (AYSAN; KARATAS; CINAR, 2003; JI et al., 2006; NAUE; ROCHA; MOURA, 2014), superfície de folhas (STROMBERG; KINKEL; LEONARD, 2000), endofíticos obtidos de raízes (TAN et al., 2006; UPRETI; THOMAS, 2015) e folhas (BYRNE et al., 2005)

Diversos estudos têm demonstrado uma maior presença de isolados bacterianos com atividade biológica contra diversas fitobactérias patogênicas quando obtidos a partir de cultivares resistentes. Estes estudos demonstram a importância de micro-organismos endófitos associados à planta na defesa contra patógenos (FENG; LI; LIU, 2013; TIAN et al., 2004; UPRETI; THOMAS, 2015).

Geralmente, para o isolamento de endofíticos antagonistas, utilizam-se amostras de plantas saudáveis nos isolamentos (LI et al., 2012). No entanto, Hong et al. (2015) inocularam plantas de *Arabidopsis* com cepas virulentas de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 para isolar endófitos antagonistas presentes nas folhas superiores 3 dias após inocular o patógeno. Obtiveram um isolado da espécie *Bacillus cereus* com forte atividade antimicrobiana contra *Pst in vitro* e o potencial agente de biocontrole foi confirmado em ensaios com plantas de tomateiro.

Tan et al. (2006) isolaram actinobactérias endofíticas a partir de amostras de plantas saudáveis e plantas que apresentavam sintomas de murcha causada por *Ralstonia solanacearum*. Neste estudo foi possível

verificar uma maior proporção de endofíticos do gênero *Streptomyces* antagonistas isolados a partir de amostras de plantas saudáveis do que de amostras de plantas doentes.

Após o isolamento é necessário caracterizar e diferenciar os isolados bacterianos. Zinniel et al. (2002) realizaram as seguintes caracterizações de bactérias endofíticas obtidas a partir de diversas espécies vegetais: caracterização morfológica (cor, forma, aspecto, opacidade, textura); motilidade, tamanho e modo de divisão foram investigados por microscopia, teste Gram utilizando solução hidróxido de potássio (KOH) 3% e produção de quitinase. Analisou-se também o perfil de ácidos graxos, a utilização de fontes de carbono e a resistência a antibióticos.

Outras técnicas para diferenciação de isolados bacterianos baseiam-se em métodos moleculares. Existem sequências de DNA repetitivo intercaladas que estão dispersas pelo genoma bacteriano. Estas sequências de DNA não são codificadoras e podem ser utilizadas para gerar perfis únicos de DNA *fingerprints* capazes de diferenciar cepas de bactérias (VERSALOVIC; DE BRUIJN; LUPSKI, 1998). Três famílias de sequências de DNA já foram amplamente estudadas em bactérias: sequência de 35-40 pb REP (repetitive extragenic palindromic); sequência de 124-127 pb ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) e elemento BOX de 154 pb (LOUWS et al., 1994)

Uma técnica molecular, amplamente empregada para diferenciar bactérias é a técnica de rep-PCR que pode ser realizada com o iniciador BOX. Métodos de diferenciação que geram *fingerprints* podem ser utilizados também na identificação de espécies de bactérias.

De acordo com Rademaker et al. (2000), estas metodologias apresentam alta eficiência e especificidade para identificação de bactérias. Esta técnica tem a vantagem de apresentar um baixo custo e de ser altamente discriminatória para espécies de diversos gêneros, como é o caso dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (LOUWS et al., 1995). Além disso, de acordo com Louws et al. (1994) a dispersão de sequências repetitivas como os elementos BOX pode ser indicativo da estrutura e evolução do genoma bacteriano.

2.4.5 Seleção de bactérias benéficas à planta

De acordo com Satyanarayana & Kunze (2009), algumas características que um bom agente de biocontrole deve possuir são: atividade antagonista contra fitopatógenos, biologia conhecida, especificidade, ter facilidade de produção em larga escala e de aplicação,

além de ser seguro ao ambiente. Outra característica que se espera de um bom agente de biocontrole é que ele apresente uma rápida resposta contra o patógeno. Além disso, uma característica interessante para micro-organismos que são aplicados na região foliar é a capacidade de resistir a fatores ambientais estressantes como radiação UV e calor (HALFELD-VIEIRA et al., 2004).

Além da capacidade de biocontrole, outro potencial a ser explorado é o de promover o crescimento vegetal. De acordo com Romeiro (2005), a introdução de micro-organismos benéficos para aumentar a produtividade agrícola é uma prática utilizada empiricamente há séculos. A capacidade de bactérias para a promoção do crescimento vegetal e melhoria da produtividade pode estar associada a diversos mecanismos. Dentre eles estão a solubilização de fosfatos, produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios (NAIK et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal podem ser classificados como diretos e indiretos. Os mecanismos diretos são produção de reguladores de crescimento como fitormônios ou compostos análogos destes. O controle biológico indiretamente proporciona a promoção do crescimento vegetal (VERMA; GANGE, 2014).

Compant, Clément e Sessitsch (2010), citam a capacidade de colonização da rizosfera e/ou da planta inteira como uma característica essencial para que rizobactérias promotoras de crescimento exerçam os efeitos benéficos desejados sob a planta. Em muitos casos, a falha dos efeitos a campo de determinado isolado de RPCP pode ser atribuída à ausência da capacidade de colonização.

Diversos ensaios *in vitro* podem ser realizados visando investigar o potencial benéfico à planta de diferentes isolados e proporcionar critérios para uma seleção inicial. O antagonismo direto ou ensaio de antibiose é um dos ensaios mais frequentes em estudos que visam a seleção de agentes de biocontrole. Estes ensaios podem ser utilizados tanto para seleção de agentes de biocontrole de patógenos fúngicos (TIAN et al., 2004) quanto de bactérias fitopatogênicas (AYSAN; KARATAS; CINAR, 2003; TAN et al., 2006; UPRETI; THOMAS, 2015). A seleção de micro-organismos capazes de produzir HCN e sideróforos também está relacionada à potencialidade para o biocontrole (UPRETI; THOMAS, 2015).

Em geral também são realizadas algumas caracterizações de atividades ou compostos produzidos pelo micro-organismo que estão diretamente relacionadas ao seu efeito benéfico à planta. A capacidade de

produzir substâncias tipo AIA (ácido indol acético), ACC deaminase pode ser investigada nesta etapa inicial de *screening* e estão relacionadas à promoção de crescimento vegetal (NAIK et al., 2008). Para a melhoria nas condições nutricionais da planta, micro-organismos capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos também podem ser selecionados utilizando-se ensaios *in vitro* (NAIK et al., 2008).

A capacidade de produzir enzimas como pectinases, celulases, quitinases, e proteases também pode ser investigada. Estas enzimas são responsáveis pela degradação da parede de patógenos fúngicos e representam uma característica desejável para o antagonismo frente este tipo de patógeno (NAIK et al., 2008; SWAIN; RAY, 2009).

Outras caracterizações podem ser realizadas *in vitro* visando selecionar isolados mais promissores para os ensaios posteriores. Numa etapa inicial também é possível caracterizar outras atividades benéficas destes micro-organismos, como por exemplo verificar a produção de enzimas de importância na indústria alimentícia (amilases), de papel (celulases) e cosmética (catalase) (PITZSCHKE, 2016; SWAIN; RAY, 2009).

Além da seleção de micro-organismos utilizando ensaios *in vitro*, outra forma de seleção é por meio de bioensaios. Entretanto, em geral, são pouco utilizados pois demandam maior tempo, espaço e material (MOURA; DA SILVA ROMEIRO; PRATA NEVES, 1998). Inicialmente os micro-organismos isolados podem ser avaliados em condições de casa de vegetação e posteriormente testados em diferentes condições a campo.

Por meio de ensaios de seleção massal com plantas, Halfeld-Vieira et al. (2004) selecionaram dez isolados de bactérias a partir do filoplano de tomateiro com potencial para o controle de doenças de parte aérea ocasionadas por *Alternaria solani*, *P. syringae* pv. *tomato*, e *Phytophthora infestans*. Em outros dois ensaios subsequentes, em condições de casa de vegetação, os autores confirmaram o potencial de 4 isolados bacterianos frente a *P. syringae* pv. *tomato* e também verificaram sua efetividade para o controle de *X. vesicatoria* no tomateiro.

Apesar de existirem inúmeros estudos a respeito do uso de agentes de controle biológico, são poucos os produtos comerciais disponíveis (BYRNE et al., 2005). Na Tabela 1 estão listados alguns estudos realizados com bactérias isoladas a partir de amostras de diferentes plantas cultivadas, para o controle biológico de doenças bacterianas.

Byrne et al. (2005) selecionaram bactérias isoladas de folhas de tomate e bactérias do gênero *Pseudomonas* por meio de ensaios em casa de vegetação e depois avaliaram os mesmos isolados em condições de

campo. Os autores verificaram que o isolado *P. syringae* Cit7, o qual reduziu a severidade da mancha bacteriana causada por *X. vesicatoria* em casa de vegetação, também foi capaz de reduzir a severidade sob condições de campo. Este mesmo isolado também foi capaz de reduzir a severidade da pinta bacteriana causada por *P. syringae* pv. *tomato*.

Tabela 1 - Estudos realizados com bactérias isoladas a partir de amostras de diferentes plantas cultivadas, para o controle biológico de doenças bacterianas.

Descrição dos isolados	Patossistema	Formas de seleção	Resultado	Referência
Bactérias endofíticas obtidas de amostras de raízes de duas cultivares de tomateiro (61)	<i>R. solanacearum</i> em tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonismo <i>in vitro</i>; • Produção de HCN (ácido cianídrico) e sideróforos 	30 isolados (<i>Pantoea oleovorans</i> , <i>P. ananatis</i> e <i>Enterobacter cloacae</i>) apresentaram antagonismo <i>in vitro</i>	Upreti e Thomas, 2015
Rizobactérias promotoras de crescimento do tomate (6)	<i>X. gardneri</i> em tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio em casa de vegetação (tratamento de sementes) 	Das RPCPs testadas contra <i>X. gardneri</i> , 1 isolado (<i>Bacillus</i> sp.) reduziu 48% severidade – Tratou semente	Naue, Rocha e Moura, 2014
Actinobactérias endofíticas isolados de raiz de cultivares de tomateiro sadio e doentes (619)	<i>R. solanacearum</i> em tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação da parede celular bacteriana; • Produção de sideróforos; • Antibiose <i>in vitro</i> 	A porcentagem de antagonistas degradadores de parede celular da bactéria foi maior em plantas doentes que saudáveis.	Tan et al., 2006
Bactérias e leveduras isoladas da rizosfera de plantas de tomate (71)	<i>E. chrysanthemi</i> em tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonismo <i>in vitro</i>; • Bioensaio em pedaços de batata 	14 inibiram o crescimento <i>in vitro</i> , 16 isolados preveniram o aparecimento de sintomas em plantas, 8	Aysan, Karatas e Cinar, 2003

			reduziram o desenvolvimento da doença entre 89% e 33% em condição controlada. 5 isolados foram testados em casa de vegetação; 1 isolado propiciou um bom nível de proteção a campo (74%)	
Isolado de <i>P. fluorescens</i> obtido de amostras de solo (1)	X. <i>vesicatoria</i> no tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito na germinação e vigor de sementes. • Ensaio a campo (20 cultivares) 	Houve redução na incidência de 60-70% para 20-30%	Kavitha e Umesha, 2007
Bactérias isoladas de folhas de tomate (50) e bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> (3)	X. <i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> e X. <i>vesicatoria</i> no tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaios em casa de vegetação e a campo 	Isolado de <i>Cellulomonas turbata</i> BT1 reduziu a severidade (45.2%) e <i>P. syringae</i> Cit7 (36.4%). Já a campo <i>P. syringae</i> Cit7 reduziu 28,9% e <i>P. putida</i> B56 23,1%	Byrne et al., 2005
Bactérias epífitas obtidas de folhas de plantas das famílias Poaceae, Fabaceae e Lamiaceae (44)	X. <i>translucens</i> pv. <i>translucens</i> no trigo	<ul style="list-style-type: none"> • Antibiose <i>in vitro</i>; • Ensaio em casa de vegetação; • Similaridade e nutricional 	Selecionou 13 isolados capazes de reduzir a população do patógeno e a severidade. Apenas 1 isolado inibiu o crescimento <i>in vitro</i> .	Stromberg, Kinkel e Leonard, 2000

			Similaridade nutricional entre as bactérias selecionadas e o patógeno. Antagonistas utilizam sacarose e inositol com mais frequência que isolados com pouca atividade antagonista.	
Bactérias promotoras de crescimento, isolados selecionadas previamente obtidas de folhas e rizosfera (5)	<i>P. syringae</i> pv. tomato, <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> e <i>X. vesicatoria</i> no tomate	• Ensaio a campo em diferentes locais	<i>P. syringae</i> Cit7, <i>P. fluorescens</i> 89B-61 e <i>Bacillus pumilus</i> SE34 reduziram a severidade da pinta e da mancha bacteriana. Bactérias aplicadas em associação foram mais eficientes do que quando aplicadas sozinhas;	Ji et al., 2006
Bactérias endofíticas obtidas do apoplasto de folhas de plantas de <i>Arabidopsis</i> infectadas com Pst (19)	<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 em <i>Arabidopsis</i> e tomate	• Ensaios <i>in vitro</i>	Obteve 19 isolados com diferentes morfologias. 1 destes apresentaram forte atividade antimicrobiana contra Pst e <i>in vitro</i> e na planta (<i>B. cereus</i>)	Hong et al., 2015

Actinobactérias endofíticas de amostras de folhas e raízes de 4 cultivares de arroz (274)	<i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>X.oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> no arroz	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaios <i>in vitro</i> 	50% dos isolados apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos um dos patógenos. A maioria dos antagonistas de <i>X. oryzae</i> pertencem as espécies <i>Streptomyces griseofuscus</i> e <i>S. hygroscopicus</i> .	Tian et al., 2004
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1) obtido de plantas saudáveis de Antúrio	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> em antúrio	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção por PCR (iturina e surfactina) • Ensaio <i>in vivo</i>, enzimas relacionadas a defesa vegetal 	Suspensão de células e filtrado do cultivo da bactéria reduziram o número de lesões em plantas de Antúrio; Aumento na atividade de enzimas relacionadas a defesa vegetal;	Li et al., 2012

* Números entre parênteses representam a quantidade de isolados avaliados nos estudos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As cultivares de tomateiro utilizadas nos experimentos de isolamento e seleção estão descritas na Tabela 2.

As amostras de sementes utilizadas para os isolamentos foram gentilmente cedidas pelas empresas Eagle Flores, Sakata, Agrocerec, Sygenta e Embrapa. Já as sementes das cultivares suscetíveis utilizadas nos ensaios de seleção *in vivo*, Santa Clara e Santa Cruz Kada da empresa ISLA foram adquiridas comercialmente.

Tabela 2 - Genótipos (cultivares/híbridos) de tomateiro utilizados nos experimentos para fins de isolamento de bactérias a partir de amostras de parte aérea, sementes e raízes. Descrição do tipo do fruto, forma de crescimento, fornecedor e resistência às bacterioses estudadas.

Cultivar ou híbrido	Tipo/ Crescimento		Distribuidor	Resistência	
				Xg	Pst
Santa Clara	Mesa	I	ISLA	S	S
Santa Cruz Kada (Paulista)	Mesa	I	ISLA	S	S
Carolina	Cereja	I	Feltrin	NC	NC
Rio Vermelho	Industrial	D	Eagle Flores	NC	R
Rio Paraná	Industrial	D	Eagle Flores	NC	R
BRS Gold	Industrial	I	Embrapa	NC	NC
T09	Crioulo	-	UFSC	NC	NC
BRS Nagai	Saladete (Híbrido)	I	Embrapa	NC	T
Cereja Rubi	Cereja	-	-	NC	NC
Coração de Boi	Mesa	I	Feltrin	NC	NC
Ângela gigante	Industrial	I	Agrocerec	NC	NC
Príncipe gigante AG90	Mesa	I	Agrocerec	S	S
Forty	Mesa	I	Sygenta	T	T
Débora Pto (Santa Cruz)	Mesa	I	Sakata	NC	R

Tyna	Mesa (Italiano)	I	Sakata	NC	R
------	--------------------	---	--------	----	---

Xg: *X. gardneri*; Pst: *P. syringae* pv. *tomato*. *NC – Cultivar não caracterizada quanto a resistência a bacterioses; T – tolerante; R- resistente e S – suscetível; Crescimento: I – Indeterminado e D – Determinado.

3.2 ISOLADOS PATOGÊNICOS E PRODUÇÃO DE INÓCULO

O isolado de *X. gardneri* foi obtido a partir de plantas de tomateiro da cultivar Carmem com sintomas característicos da mancha bacteriana, cultivadas em Águas Mornas-SC, e gentilmente cedido pela Empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. A identificação da bactéria foi realizada junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa - DF, pela Dra. Alice Maria Quezado Duval. Por meio da técnica de BOX-PCR utilizando o *primer* BOX 1AR (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), constatou-se que o isolado pertence a espécie *X. gardneri* (Grupo D).

Também foi avaliada a capacidade antagonista frente a um isolado patogênico de *P. syringae* pv. *tomato*, gentilmente cedido pelo Professor Dr. José Rogério de Oliveira da Universidade Federal de Viçosa. Obtido originalmente a partir de planta de tomateiro com sintomas típicos, em plantio comercial no município de Coimbra (MG), o isolado foi identificado por sequenciamento do gene RNAr 16S. Foram realizados testes de patogenicidade de acordo com Schaad, Jones e Chun (2000).

Todos os isolados patogênicos foram mantidos em tampão fosfato (7,4 mM KH₂PO₄; 8,6 mM K₂HPO₄, pH 7.0), à temperatura de 25 °C. A bactéria mantida em tampão foi transferida, com auxílio da alça de platina, para placas de Petri com ágar nutriente (NA) (peptona 5,0 g.L⁻¹; extrato de carne 3,0 g.L⁻¹; ágar 15,0 g.L⁻¹). Após 48h de incubação a 25°C, as bactérias crescidas neste meio foram repicadas para novas placas contendo meio NA, tantas quantas foram necessárias para os experimentos, e novamente incubadas por 24h a 25°C.

A suspensão de colônias bacterianas de *X. gardneri* crescidas neste meio foi preparada com solução salina estéril 0,85% NaCl (v/v) e a concentração da suspensão ajustada com auxílio de espectrofotômetro para a densidade ótica de 0,6 unidades de absorbância a 600 nm (aproximadamente 1 X 10⁸ UFC/mL) (LUIZ et al., 2012). No caso do isolado de *P. syringae* pv. *tomato*, a concentração da suspensão foi ajustada para densidade ótica de 0,2 unidades de absorbância a 540 nm (aproximadamente 1 X 10⁸ UFC/mL) (ANDRADE et al., 2013).

3.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE PLANTAS DE TOMATE DE DIFERENTES CULTIVARES

Sementes das diferentes cultivares foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido com 128 células contendo substrato comercial Tropstrato HT®. Após 30 dias, as plântulas com 10 cm de altura foram transplantadas para vasos de 1L contendo solo adubado e irrigadas de acordo com a necessidade.

As coletas foram realizadas entre os meses de julho/2015 a março/2016 e as amostras obtidas a partir de plantas de tomateiro em diferentes estágios fenológicos e cultivares distintas. Como critério de seleção de folhas, flores e raízes foram coletadas amostras apenas de plantas com tecido vegetal sadio: sem manchas, lesões ou danos mecânicos ocasionados por patógenos ou insetos. Algumas das cultivares utilizadas nos experimentos têm características de resistência varietal contra as bacterioses estudadas, de acordo com a Tabela 2 do item 3.1.

Amostras de folhas, flores e raízes foram coletadas e o material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos identificados e permaneceu refrigerado a 4°C até o isolamento. Os procedimentos de isolamento foram realizados em no máximo 72 horas após a coleta. Primeiramente, o material foi lavado em água corrente para retirada de solo e poeira e depois seco com papel-toalha.

Utilizou-se a metodologia descrita por Romeiro (2007) com algumas modificações para o isolamento de bactérias. Realizou-se a desinfecção da superfície das sementes por meio da imersão em etanol 70% por 30s para quebrar a tensão superficial e permitir o contato com o agente desinfetante. Em seguida, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (0,5% cloro ativo) por 1 min para desinfecção, solução 10% de NaHCO₃ para inibição do crescimento fúngico (TAN et al., 2006) e duas vezes em água deionizada estéril para remoção do cloro residual.

Já as amostras de folhas e flores foram desinfetadas superficialmente pela imersão em etanol 70% por 30s, hipoclorito de sódio (2-4% cloro ativo) por 2 min e três lavagens sucessivas em água deionizada estéril. As raízes de plantas de tomate foram retiradas dos vasos e procedeu-se a remoção do solo agregado. Em seguida foram imersas em etanol 70% (v/v) por 5 min e depois em solução de hipoclorito de sódio 0,9% (w/v de cloro disponível) por 20 min. Posteriormente, as amostras foram imersas em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃)

10% por 10 min e lavadas três vezes em água deionizada estéril (TAN et al., 2006)

Para o isolamento de bactérias a partir de sementes, amostras compostas por 10 sementes de cada cultivar conforme Tabela 2, foram maceradas em cadinho com auxílio de pistilo em 100 μ L de solução salina NaCl 0,85% suplementadas com 0,01% de Tween 20. Posteriormente transferiu-se o macerado para tubos Eppendorf e completou-se o volume para 1 mL. As amostras foram incubadas em incubadora microprocessada com agitação orbital (Dist - MOD-DI160I) a 100 rotações por minuto por 3h. Realizou-se diluição seriada e transferiram-se alíquotas de 100 μ L da diluição 10^{-3} para três placas de Petri contendo meio NA.

As amostras de folhas foram compostas por seis discos de 1 cm de diâmetro obtidos da 2ª folha verdadeira e transferidos para tubos Eppendorf de 2 mL contendo 300 μ L de solução salina NaCl 0,85%. Já para as amostras de raiz e flor, pesou-se 1g de tecido em balança de precisão e em seguida procedeu-se a desinfecção do material conforme descrito anteriormente. Após a secagem, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina NaCl 0,85% e maceradas com auxílio de bastão de vidro. Os macerados foram incubados por 4-6h sob agitação constante e Incubadora com agitação orbital (100 rotações por minuto) a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ para liberação de bactérias endofíticas. Posteriormente realizou-se diluição seriada até 10^{-3} para amostras de folhas e flores e 10^{-6} para amostras de raiz. As diluições foram transferidas para placas de Petri contendo meio NA e mantidas em estufa incubadora a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 96h.

Avaliou-se diariamente a presença de crescimento bacteriano e ao final quantificou-se o número de isolados com diferentes morfologias e os micro-organismos foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio NA. Procederam-se três passagens para novas placas contendo NA pela técnica de esgotamento do inóculo descrita por Pepper, Gerba e Brendecke (1995), para a obtenção de colônias bacterianas puras.

Para verificar a efetividade da desinfecção superficial e caracterizar a possível origem do micro-organismo (endofítico ou epifítico) realizou-se a metodologia de contraprova descrita por Romeiro (2007) com algumas adaptações. Fragmentos de 1 cm da amostra de tecido vegetal ou uma semente de cada cultivar, ao término do processo de desinfecção superficial, foram imersos em tubo de ensaio contendo caldo nutriente (peptona 5,0 g.L^{-1} ; extrato de carne 3,0 g.L^{-1}) e os tubos foram incubados sob agitação a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. O crescimento bacteriano no tubo foi considerado como um indicativo de que o processo de desinfecção superficial foi deficiente e, portanto, os micro-organismos

obtidos destas amostras são epifíticos e/ou capazes de sobreviver ao processo de desinfecção.

Para o armazenamento temporário das bactérias, foram empregadas duas metodologias. A primeira delas foi o método de Castalani descrito por Sinclair & Dhingra (1995). Após o cultivo em meio NA por 24h, as bactérias foram transferidas com auxílio de alça de repicagem para Eppendorf contendo 1 mL de tampão fosfato (pH 7,0) o mesmo tampão utilizado para conservação dos isolados patogênicos descritos no item 3.2. Os tubos foram vedados com parafilme e mantidos sob temperatura ambiente. Outro método utilizado no armazenamento a longo prazo dos isolados obtidos foi o cultivo em tubos contendo 1 mL de caldo nutriente por 48h a 25°C da bactéria suplementado com glicerol 30% (v/v) e mantidos a -80°C.

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DOS ISOLADOS

3.4.1 Caracterização morfológica

Os isolados foram caracterizados de acordo com a morfologia de colônia (tamanho, aspecto, borda e coloração) em meio NA. Para esta caracterização, os isolados foram cultivados em caldo nutriente por 48h a $26\pm 2^\circ\text{C}$ e após este período, alíquotas de 5 μL deste caldo foram semeadas em placas contendo ágar nutriente. A morfologia de colônia foi verificada após ser observado o crescimento evidente de colônias bacterianas 24-72h após o início do cultivo.

3.4.2 Caracterização fenotípica

Foi realizado o teste Gram utilizando solução 3% KOH de acordo com Suslow, Schroth e Isaka (1982) para diferenciar os isolados em dois grupos de bactérias: Gram-negativas e Gram-positivas. Com o auxílio de pipeta Pasteur, depositaram-se duas gotas da solução KOH em uma lâmina de vidro. Em seguida transferiu-se com uma alça um pouco da colônia bacteriana crescida em meio NA e homogeneizou-se na gota da solução KOH. Verificou-se a formação de fio mucoide entre a alça e a lâmina, indicativo de bactéria Gram-negativa.

A habilidade de produzir pigmentos fluorescentes foi verificada de acordo com Schaad, Jones & Chun (2000) utilizando-se o meio King B (KB) (Anexo 2). Após o crescimento da colônia, a presença de pigmentos fluorescentes difusíveis foi verificada sob luz UV ($\lambda=366$). Como

controle utilizou-se a cepa de *P. syringae* pv. *tomato* que apresenta fluorescência de coloração azul-esverdeada e produzem menor quantidade de pigmentos fluorescentes que bactérias com hábitos saprofitos deste mesmo do gênero (SCHAAD; JONES; CHUN, 2000).

Verificou-se a produção de catalase, celulase, amilase e pectinase para fins de caracterização dos isolados. A produção de catalase foi verificada adicionando-se uma gota de solução H_2O_2 a 3% em uma lâminula e depositando-se uma alçada da cultura sobre a gota. A formação de bolhas é indicativo da produção da enzima (SCHAAD; JONES; CHUN, 2000).

Para verificar a produção de celulase, 10 μ L de suspensão bacteriana foram depositados em quatro pontos de uma placa contendo Ágar CMC (Anexo 2). Após incubar por 48h, foram adicionados 5 mL de solução de iodo Gram (2,0g KI e 1,0g de iodo em 300 mL de água destilada) por 5 min (KASANA et al., 2008). A atividade enzimática foi comprovada pela formação de um halo em torno da colônia bacteriana e o diâmetro dos halos foi mensurado e comparado entre os isolados.

Para verificar a produção de amilase, utilizou-se meio de cultivo suplementado com amido solúvel 0,2%. Adicionaram-se 5 μ L de cultivo da bactéria em meio líquido em quatro pontos equidistantes nas placas. Após o crescimento das colônias bacterianas (24-48h), 5 mL de solução de iodo Gram (2,0g KI e 1,0g de iodo em 300 mL de água destilada) foram adicionados às placas por 5 min e, em seguida, as zonas de clareamento formadas em torno das colônias foram mensuradas.

A atividade pectinolítica foi verificada utilizando-se meio básico M9 com extrato de levedura 0,5% e pectina 1% (Anexo 2). Após o crescimento bacteriano, 5 mL de solução lugol foram adicionados à placa e efetuaram-se lavagens com água destilada. Os halos incolores em torno da colônia foram mensurados e comparados entre os diferentes isolados.

A produção de sideróforos foi verificada de acordo com metodologia proposta por Schwyn & Neilands (1987), utilizando-se o meio Cromo Azurol S (CAS) (Anexo 2). As bactérias foram cultivadas em meio TSB e após 48 h transferiram-se 10 μ L do cultivo em meio líquido para placas de Petri contendo meio CAS. As placas foram incubadas por 24-48 h e verificou-se a alteração de coloração do meio de azul para amarelo, indicativo da produção de sideróforos.

A capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foi avaliada de acordo com metodologia descrita por De Freitas, Banerjee e Germid (1997), e utilizou-se o meio BDA- $CaHPO_4$ (Anexo 2). As bactérias crescidas em meio TSB foram semeadas em placas contendo BDA- $CaHPO_4$ e após 12 dias os halos em torno das colônias foram mensurados.

A presença destes halos de clareamento em torno da colônia bacteriana foi considerada como indicativo da capacidade de solubilizar a fonte de fosfato inorgânico presente no meio. Os experimentos foram repetidos duas vezes com 4 replicatas por isolado endofítico avaliado.

3.4.3 Diferenciação genotípica entre antagonistas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*

A diferenciação genotípica entre os isolados antagonistas foi realizada pela técnica de BOX-PCR. Esta técnica foi realizada para a diferenciação de alguns dos isolados bacterianos do gênero *Pseudomonas* obtidos. Utilizou-se o *primer* BOX 1AR (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') (VERSALOVIC et al., 1994). O DNA das bactérias foi extraído a partir de suspensões de bactérias em tampão fosfato (pH 7.0) ajustadas em espectrofotômetro para $A_{600}=0,6$. Utilizou-se o kit de extração Wizard (Promega) seguindo-se as instruções do fabricante.

A mistura de reação para PCR foi composta por 1 μ L de DNA extraído, 1 μ M do primer BOX 1AR, 0,8 mM de cada dNTP, 5 μ L de Tampão 5X Green GoTaq® Flexi, 3mM de MgCl, 1,25 U GoTaq® DNA Polimerase, 2,5 μ L DMSO e H₂O ultrapura para completar um volume final de 25 μ L.

As condições de PCR utilizadas foram: desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1,5 minutos a 55 °C e 1 min a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C durante 3 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (89 mM tris (pH 7,6); 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), a 90 V por aproximadamente 2h.

Após a eletroforese, o gel foi corado utilizando como agente intercalante GelRed™ juntamente ao marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Ludwig Biotec). O produto da reação foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. Os perfis dos isolados foram analisados visualmente de acordo com a presença e ausência de bandas e comparados entre os isolados.

3.5 ENSAIO DE ANTIBIOSE *IN VITRO*

A caracterização *in vitro* do potencial antibacteriano dos isolados foi verificada de acordo com metodologia empregada por Cao et al. (2005), com algumas modificações. Para isto, uma alíquota de 500 μ L de

cultivo líquido em caldo nutriente por 48h do patógeno testado (*X. gardneri* ou de *P. syringae* pv. tomato) foi depositada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.

O meio NA semissólido fundente (peptona 5,0 g.L⁻¹; extrato de carne 3,0 g.L⁻¹; ágar 7,5 g.L⁻¹ mantido a 48 °C para não solidificar) foi adicionado sobre a alíquota e em seguida as placas foram homogeneizadas. Após o meio solidificar, 5 µL do cultivo 48h em TSB dos isolados foram depositados na superfície do meio em quatro pontos equidistantes na placa. As placas foram incubadas a 26±2°C por 72h.

Os isolados foram caracterizados pela presença ou ausência de atividade inibitória sobre o patógeno testado, *X. gardneri* ou *P. syringae* pv. tomato, de acordo com a formação de um halo em torno da colônia da fitobactéria. As avaliações para inibição do patógeno bacteriano foram realizadas após 72 h de incubação, medindo-se os halos de inibição do patógeno e a atividade antimicrobiana expressa em mm foi obtida pela diferença entre o diâmetro da zona de inibição e o diâmetro da colônia do antagonista testado.

Os ensaios foram realizados ao menos duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado e os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana foram analisados utilizando-se análise de variância e teste Tukey (P <0,05) para separação das médias. Cada isolado bacteriano foi testado em quatro replicatas, representada por uma placa de Petri. Ao final selecionaram-se para os bioensaios de proteção com plantas de tomateiro os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos dois patógenos (*X. gardneri* e *P. syringae* pv. tomato).

3.6 BIOENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA

Foram realizados dois experimentos independentes em condições de casa de vegetação. O objetivo destes experimentos foi verificar o potencial dos isolados selecionados *in vitro* para a redução da severidade dos sintomas da mancha bacteriana causada por *X. gardneri*. O primeiro experimento foi realizado entre os meses de outubro e novembro/2016 e o segundo experimento entre os meses de dezembro/2016 e janeiro/2017.

Foram utilizadas nos experimentos plantas da cultivar suscetível à mancha bacteriana, Santa Cruz Kada e estas foram semeadas conforme o item 3.1. Após 30 dias, duas plântulas com 10 cm de altura foram transplantadas para vasos de 1L contendo solo adubado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas e o solo adubado de acordo com

a necessidade. Os vasos eram periodicamente aleatorizados para que as condições de crescimento fossem as mais homogêneas possíveis.

Quando apresentavam 3 folhas verdadeiras realizou-se o tratamento com os isolados endofíticos selecionados com base no ensaio de antibiose *in vitro* (Item 3.5). Os tratamentos foram aplicados pulverizando-se 15 mL por vaso da suspensão do antagonista. Tanto a parte abaxial quanto a parte adaxial das folhas foi pulverizada com os tratamentos. As suspensões foram preparadas com solução salina estéril 0,85% NaCl (v/v) e a concentração da suspensão ajustada com auxílio de espectrofotômetro para a densidade ótica de 0,6 unidades de absorbância a 600 nm.

O controle negativo consistiu em pulverizar na parte aérea uma solução salina 0,85% NaCl estéril. As suspensões foram aplicadas nas plantas 48 h antes da inoculação do patógeno. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e com alta umidade, mantendo sempre um filme de água sobre a superfície foliar com auxílio de borrifador.

A inoculação do patógeno consistiu em aplicar com auxílio de pulverizador, 15 mL por vaso de suspensão de *X. gardneri* (10^8 U.F.C.mL⁻¹). Logo após, as plantas foram incubadas em câmara úmida por 48 h. O tratamento e a inoculação do patógeno foi realizado com auxílio de pulverizador acoplado a um compressor de ar (marca Schulz, Brasil – pressão de 25 lgf/pol², potência de 180W).

Foram realizadas duas avaliações da severidade da mancha bacteriana para cada experimento: no primeiro, foram realizadas avaliações aos 7 e aos 14 dias após a inoculação do patógeno. No segundo experimento, as avaliações foram realizadas aos 14 e 21 dias após a inoculação com *X. gardneri*.

As avaliações foram realizadas com auxílio de escala diagramática proposta por Mello, Takatsu e Lopes (1997) (Anexo 1). O resultado obtido foi expresso em porcentagem de área foliar lesionada de quatro folhas em cada parcela experimental. Foram realizadas 4 repetições por tratamento e as folhas avaliadas foram obtidas a partir da porção intermediária de duas plantas por repetição (vaso).

A análise de dados referentes à severidade foi realizada utilizando-se o software STATISTICA versão 10. A análise de variância foi realizada para inferir o efeito do tratamento com as bactérias sobre a severidade da mancha bacteriana causada por *X. gardneri*. Os dados foram também analisados utilizando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação entre médias.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Ao todo foram isoladas 119 bactérias a partir de amostras de tomateiro de diferentes cultivares. As amostras utilizadas nos isolamentos foram obtidas a partir de plantas de tomateiro de 15 cultivares/híbrido diferentes, mantidas sob condições de cultivo protegido. Também foram isoladas bactérias endofíticas a partir de plantas de tomate obtidas em condições de campo, nas proximidades do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e cuja cultivar não foi identificada.

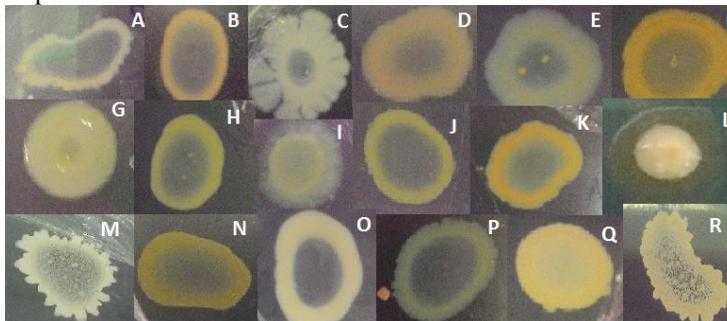
Os isolados obtidos conforme descrito no item 3.3 foram separados em 11 grupos morfológicos, de acordo com a Tabela 3. Na Figura 3 estão representadas algumas morfologias das colônias de isolados de bactérias endofíticas após o cultivo por 48h a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio NA.

Tabela 3 - Descrição das características morfológicas da colônia dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de plantas de tomateiro.

Grupos	Características morfológicas da colônia
A	Colônias médias, brilhosas de aspecto cremoso e liso, circulares com borda regular e coloração creme.
B	Colônias de tamanho variado, brilhosa, de aspecto translúcido, com borda regular e coloração amarela.
C	Colônias grandes de aspecto filamentosos, borda irregular e cor branca.
D	Colônias grandes, de aspecto cremoso e liso, circulares com borda regular e coloração branca.
E	Colônias pequenas, brilhosas de aspecto cremoso e liso, circulares com borda regular e coloração amarelo forte.
F	Colônias grandes de aspecto rugoso, circular, borda irregular e cor branca.
G	Colônias de tamanho variado, brilhosas de aspecto cremoso e liso, circulares com borda regular e coloração laranja.
H	Colônias de tamanho variado, mucoide, brilhosa, de aspecto cremoso, com borda regular e coloração branca.
I	Colônias de tamanho variado, brilhosas de aspecto cremoso e liso, circulares com borda regular e cor creme.

J	Colônias pequenas, brilhosa, de aspecto cremoso, com borda regular e coloração creme.
K	Colônias de tamanho variado, mucoide, brilhosa, de aspecto cremoso, com borda regular e coloração creme.

Figura 3 - Caracterização morfológica das colônias, após o cultivo por 48h a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio NA, de isolados obtidos a partir da parte aérea, raízes e sementes de plantas de diferentes cultivares de tomateiro.



*As letras representam os isolados: A - ISO050; B - ISO121; C - ISO077; D - ISO043; E - ISO123; F - ISO069; G - ISO086; H - ISO128; I - ISO133; J - ISO083; K - ISO089; L - ISO082; M - ISO055; N - ISO065; O - ISO127; P - ISO137; Q - ISO046; R - ISO044.

Para uma diferenciação inicial dos isolados, adotaram-se alguns critérios: as informações sobre a origem das amostras (cultivar, parte do vegetal, data de isolamento), o resultado da caracterização morfológica (morfologia de colônia - item 3.4.1) e os resultados da caracterização fenotípica parcial dos 119 isolados (teste Gram, produção de pigmentos fluorescentes e catalase – item 3.4.2). Estes critérios permitiram distinguir 34 isolados de bactérias endofíticas.

A Tabela 4 mostra a frequência relativa de isolados de acordo com a parte do vegetal da amostra de origem. Foram obtidos 15 isolados a partir de amostras da parte aérea de plantas de tomateiro, 10 isolados a partir de amostras de raízes e 9 isolados a partir de amostras de sementes.

Tabela 4 - Frequência relativa (%) de 34 isolados obtidos a partir de diferentes cultivares de tomateiro, de acordo com a parte vegetal da qual foi obtida a amostra para o isolamento.

Parte vegetal	Número de isolados Morfofenotipicamente diferentes	Frequência relativa
---------------	--	---------------------

Parte aérea*	15	44,11%
Raiz	10	29,41%
Semente	9	26,47%

*Amostras de parte aérea foram obtidas de folhas e flores de plantas de tomateiro.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS E DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA ENTRE ANTAGONISTAS

Dentre os 34 isolados, 21 bactérias foram caracterizadas como Gram-negativas e 13 como Gram-positivas. Ao todo, foram isoladas nove bactérias Gram-negativas produtoras de pigmentos fluorescentes em meio KB, característica associada ao gênero *Pseudomonas* (Figura 4 – A). Maiores estudos moleculares são necessários para confirmar a identidade destes isolados selecionados. No presente estudo, foi realizado apenas uma caracterização parcial baseada na morfologia de colônia e testes bioquímicos.

Estas bactérias caracterizadas como possivelmente do gênero *Pseudomonas* foram obtidas a partir de amostras da parte aérea (ISO043, ISO117, ISO106 e ISO087), de amostras de raiz (ISO110, ISO137 e ISO133) e de sementes (ISO125 e ISO075). Estes isolados foram obtidos de amostras de cinco cultivares de tomateiro diferentes: Rio Paraná, Príncipe Gigante, Tyna, BRS Gold e Forty.

Os isolados também foram caracterizados quanto à produção de compostos relacionados à melhoria da qualidade nutricional de plantas. Foi avaliado *in vitro* a capacidade de produzir sideróforos e solubilizar fosfatos inorgânicos dos 34 isolados obtidos (Tabela 5).

Ao todo 24 isolados de bactérias endofíticas foram capazes de produzir sideróforos em meio CAS. Dentre os isolados que produziram esta molécula a maioria foi obtida a partir de amostras de parte aérea (12 isolados). A Figura 4-B mostra a caracterização da produção de sideróforos em meio CAS devido à alteração na coloração do meio de azul para amarelo em torno da colônia do isolado.

Figura 4 - Caracterização de isolados de bactérias endofíticas quanto à: (A) produção de pigmentos fluorescentes em meio KB sob luz UV $\lambda=366$ nm (ISO133, ISO137 e ISO110); (B) produção de sideróforos em meio CAS, evidenciada pela alteração da coloração do meio de azul para amarelo (ISO069).

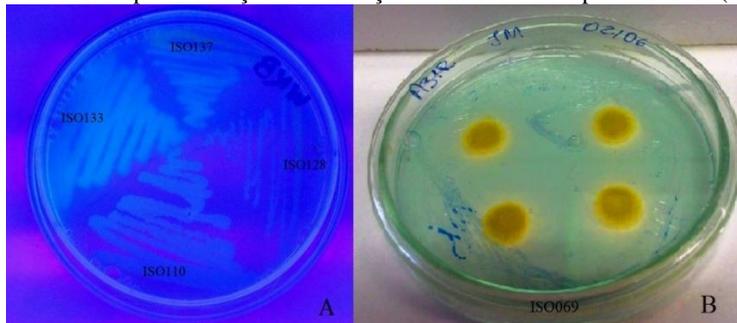
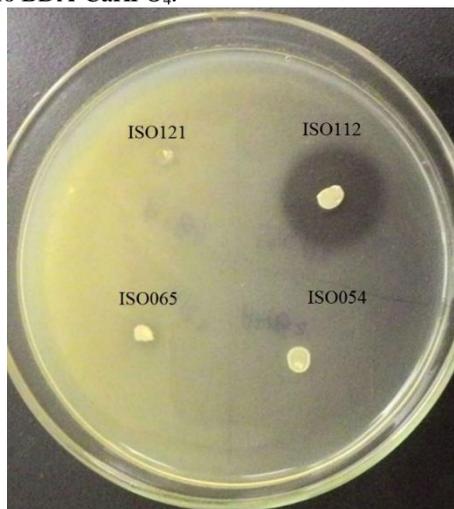


Figura 5 - Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico do isolado ISO112 cultivado em meio BDA-CaHPO₄.



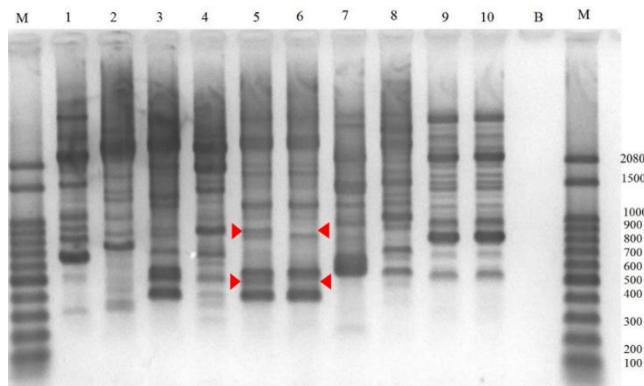
Dentre os 34 isolados de bactérias endofíticas testados, 17 (50%) foram caracterizados como positivos para capacidade de solubilizar fosfato bicálcico (Tabela 5). Na Figura 5, esta capacidade é representada pela formação de halos de clareamento em torno das colônias bacterianas em meio BDA-CaHPO₄.

Tabela 5 - Reação de Gram, produção de sideróforos e capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos de 34 isolados de bactérias endofíticas obtidos a partir de amostras de tomateiro.

Isolado	Tipo de amostra	Gram	SID	FOS
ISO077	Folha	+	+	+
ISO042	Raiz	-	-	-
ISO069	Flor	-	+	-
ISO043	Flor	-	+	++
ISO054	Folha	-	+	-
ISO113	Folha	-	+	+
ISO100	Folha	+	+	-
ISO083	Folha	-	+	+
ISO117	Folha	-	+	+++
ISO110	Raiz	-	+	+
ISO112	Raiz	-	+	+++
ISO098	Raiz	+	+	-
ISO082	Folha	-	+	+
ISO106	Folha	-	+	-
ISO087	Folha	-	+	-
ISO127	Folha	-	-	+
ISO099	Folha	+	-	-
ISO104	Raiz	+	-	+++
ISO088	Folha	+	-	-
ISO050	Raiz	-	+	++
ISO055	Semente	+	-	-
ISO044	Semente	+	+	-
ISO084	Semente	+	+	-
ISO046	Semente	+	-	-
ISO058	Semente	+	-	-
ISO123	Semente	-	+	-
ISO125	Semente	-	+	++
ISO075	Semente	-	+	++
ISO086	Folha	+	+	-
ISO065	Raiz	-	-	+
ISO137	Raiz	-	+	+++
ISO133	Raiz	-	+	+
ISO128	Raiz	-	+	+
ISO057	Semente	+	-	-

SID: produção de sideróforos; FOS: solubilização de fosfato inorgânico (- = sem zona de clareamento; + = zona de clareamento menor 5 mm de diâmetro; ++ = zona de clareamento entre 5 e 10 mm de diâmetro; +++ = zona de clareamento maior que 10 mm de diâmetro).

Figura 6 - Perfil BOX-PCR de 8 isolados de bactérias endofíticas e dos patógenos *X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato*. Imagem do gel de agarose a 1,5%, resultante de eletroforese mostrando os produtos de amplificação das bactérias.



1 - Xg; 2 – ISO127; 3 – ISO065; 4 – ISO082; 5 – ISO133; 6 - Pst; 7 – ISO113; 8 – ISO121; 9 – ISO137; 10 – ISO043; M - Marcador molecular de 100 pb; B - controle negativo.*as setas indicam as diferenças no padrão de bandas visualizadas entre o isolado de bactéria endofítica ISO133 (5) e o isolado patogênico Pst (6)

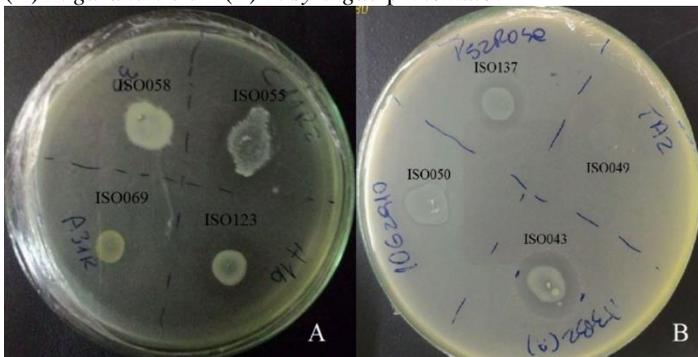
Devido à similaridade fisiológica que os isolados caracterizados como possivelmente do gênero *Pseudomonas* apresentaram foi necessário utilizar técnica molecular BOX-PCR para diferenciação dos mesmos. Dois isolados de uma mesma espécie de bactéria, possivelmente pertencente ao gênero *Pseudomonas*, foram obtidos a partir de amostras de parte aérea e de raiz da mesma planta. Na Figura 6 são apresentados os perfis genômicos de diferentes isolados gerados com o auxílio do iniciador BOX 1AR. De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que o perfil genômico do isolado ISO043 (perfil BOX-PCR número 10) obtido a partir de amostra de parte aérea de uma planta voluntária de tomateiro é igual ao perfil genômico do isolado ISO137 obtido de amostra de raiz (perfil BOX-PCR número 9).

Outros dois isolados também caracterizados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* ISO127 (perfil BOX-PCR número 2) e o ISO133 (perfil BOX-PCR número 5) apresentaram perfis BOX-PCR distintos daquele apresentado por ISO043 e ISO137. Além disso, o ISO133 apresenta um perfil BOX-PCR muito similar ao do isolado patogênico de *P. syringae* pv. *tomato* (perfil BOX-PCR número 6). Uma diferença detectável que pode ser visualizada pela presença de duas bandas no perfil ISO133, fragmentos de DNA com aproximadamente 910 pb e 495 pb.

4.3 ENSAIO DE ANTIBIOSE *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Na Figura 7 estão duas placas representativas do ensaio de antibiose. É possível verificar a formação de halos em torno das colônias dos isolados ISO055 e ISO123 (A) e ISO137 e ISO043 (B). Os halos de inibição apresentados em A referem-se ao patógeno causador da mancha bacteriana (*X. gardneri*) e em B a bactéria fitopatogênica que causa a pinta bacteriana do tomateiro (*P. syringae* pv. *tomato*).

Figura 7 - Ensaio de antibiose *in vitro* e presença de halos de inibição dos patógenos em torno da colônia dos isolados endofíticos. Patógeno avaliado em (A) *X. gardneri* e em (B) *P. syringae* pv. *tomato*.



A Tabela 6 mostra os resultados expressos (mm) que correspondem à atividade antimicrobiana dos isolados endofíticos frente aos dois patógenos testados. Ao todo 20 isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente a pelo menos um dos patógenos causadores de manchas foliares do tomateiro. A atividade antimicrobiana foi caracterizada como positiva e comparada entre os isolados de acordo com o tamanho médio dos halos de inibição em torno da colônia da bactéria endofítica.

Neste estudo, aproximadamente 78% dos isolados endofíticos obtidos a partir de amostras de sementes apresentaram atividade antimicrobiana frente a pelo menos um dos patógenos avaliados. Já 60% dos isolados obtidos a partir de amostras de raiz e em torno de 46% dos isolados de parte aérea de plantas de tomateiro apresentaram inibição de ao menos um dos patógenos avaliados.

A maioria dos isolados apresentou atividade antimicrobiana frente a apenas um dos dois patógenos testados. Apenas os isolados ISO043,

ISO137 e ISO057 inibiram o crescimento tanto de Pst quanto de Xg. O tipo e origem da amostra utilizada no isolamento dos isolados antagonistas também variaram. A maioria dos isolados que inibiram o crescimento *in vitro* de *X. gardneri* foram obtidos a partir de amostras de planta obtida em condições de campo, cuja cultivar não foi identificada (ND). Já no caso dos antagonistas de *P. syringae* pv. *tomato*, além dos isolados ISO043, ISO137 obtidos de cultivar não definida, foram isolados dois endófitos com capacidade antagonista de cada uma das cultivares Rio Vermelho, Tyna e BRS Gold.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana de 20 isolados de bactérias endofíticas contra *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) e/ou *X. gardneri* (Xg) após 72 horas de incubação*. A atividade antimicrobiana (mm) foi obtida pela diferença entre o diâmetro da zona de inibição e o diâmetro da colônia do isolado testado.

Isolado	Tipo de amostra	Cultivar	Halo de inibição (mm)	
			Xg	Pst
ISO125	Semente	Príncipe Gig.	42,5 ± 1,7 c	-
ISO043**	Flor	ND	20,0 ± 2 bc	10,0 ± 2,8 a
ISO123	Semente	Coração de boi	9,0 ± 2,8 ab	-
ISO137**	Raiz	ND	7,0 ± 0 ab	7,0 ± 0 ab
ISO054	Folha	ND	5,0 ± 1,4 a	-
ISO044	Semente	Cereja Rubi	4,7 ± 2,3 a	-
ISO055	Semente	Nagai	3,5 ± 0,7 a	-
ISO127	Folha	Rio Paraná	3,0 ± 0 a	-
ISO057**	Semente	Carolina	3,0 ± 0 a	27,0 ± 4,2 f
ISO128	Raiz	ND	3,0 ± 1,4 a	-
ISO042	Raiz	ND	2,5 ± 1,5 a	-
ISO088	Folha	Rio Vermelho	-	17,0 ± 2,3 f
ISO058	Semente	Príncipe Gig.	-	2,5 ± 0,7 e
ISO113	Folha	Forty	-	3,7 ± 0,7 ce
ISO098	Raiz	Rio Vermelho	-	4,0 ± 0 cde
ISO133	Raiz	BRS Gold	-	4,0 ± 1,0 bcd
ISO082	Folha	Tyna	-	5,7 ± 0,5 abcd
ISO099	Folha	Tyna	-	6,3 ± 0,5 abd
ISO084	Semente	BRS Nagai	-	7,0 ± 0 ab
ISO065	Raiz	BRS Gold	-	8,3 ± 1,1 a

(-) Isolado não apresentou formação de halo de inibição. ND: Cultivar não determinada. *Não foi verificado a formação de halos de inibição contra nenhum dos patógenos testados para 14 dos 34 endofíticos avaliados. Isolados com as mesmas letras, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey de a 5% de significância. Os dados foram transformados pela função logarítmica.

Em sua maioria, bactérias com capacidade antagonista frente ao patógeno causador da mancha bacteriana foram obtidos de amostras de sementes (45,45%). Em contrapartida, a maioria dos isolados de bactérias endofíticas com atividade antimicrobiana frente a *P. syringae* pv. *tomato* foi obtida a partir de amostras de parte aérea (41,66%).

A caracterização quanto à produção de enzimas hidrolíticas foi realizada apenas para os 20 isolados bacterianos que apresentaram atividade antimicrobiana frente *X. gardneri* e/ou *P. syringae* pv. *tomato*. Verificou-se que três isolados eram capazes de produzir amilases: ISO044, ISO055 e ISO65 (Figura 8) e quatro isolados são produtores de pectinases: ISO044, ISO055, ISO082 e ISO099.

Nenhum dos 20 isolados de bactérias endofíticas que apresentaram atividade antimicrobiana apresentou atividade celulolítica. A Tabela 7 mostra um resumo dos principais resultados obtidos nas caracterizações dos isolados bacterianos.

Figura 8 - Crescimento das colônias bacterianas em meio de cultivo suplementado com amido solúvel 0,2%. Após incubar as placas por 48h a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ adicionaram-se 5 mL de solução de iodo Gram. As zonas de clareamento formadas em torno das colônias são indicativas da produção de amilase pelos isolados ISO044 (A) e ISO065 (B)



Tabela 7 - Caracterização fenotípica dos 20 isolados selecionados devido à presença de atividade antimicrobiana frente aos patógenos *X. gardneri* e/ou *P. syringae* pv. *tomato*.

Isolado	Amostra/Cultivar	Xg	Pst	GRAM	FLU	CAT	CEL	AMI	PEC	SID	FOS
ISO057	Semente/Carolina	+	+++	+	-	+	-	-	-	-	-
ISO044	Semente/ Cereja Rubi	+	-	+	-	+	-	++	+++	+	-
ISO123	Semente/Cor. de boi	++	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ISO113	Folha/ Forty	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
ISO065	Raiz/BRS Gold	-	++	-	-	+	-	+	-	-	+
ISO133	Raiz/BRS Gold	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
ISO055	Semente/Nagai	+	-	+	-	-	-	++	+++	-	-
ISO084	Semente/Nagai	-	++	+	-	+	-	-	-	+	-
ISO043	Flor/ND	+++	++	-	+	+	-	-	-	+	++
ISO054	Folha/ND	++	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ISO042	Raiz/ND	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ISO128	Raiz/ND	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
ISO137	Raiz/ND	++	++	-	+	+	-	-	-	+	+++
ISO058	Semente/Princ. Gig.	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
ISO125	Semente/Princ. Gig.	+++	-	-	+	+	-	-	-	+	++
ISO127	Folha/Rio Paraná	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
ISO088	Folha/Rio Vermelho	-	+++	+	-	+	-	-	-	-	-
ISO098	Raiz/Rio Vermelho	-	+	+	-	+	-	-	+++	+	-

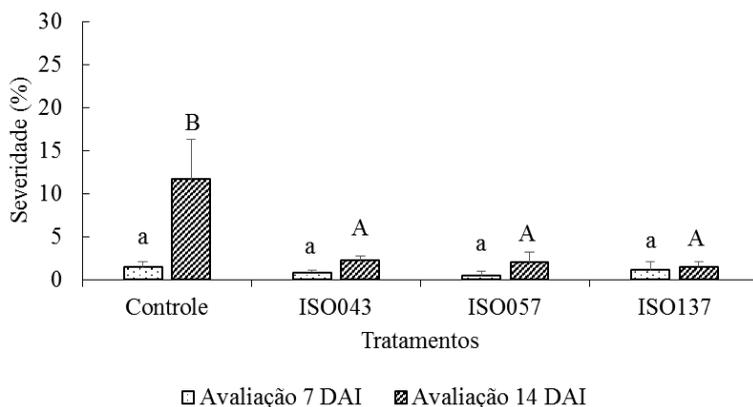
ISO082	Folha/ Tyna	-	++	-	-	+	-	-	-	+	+
ISO099	Folha/ Tyna	-	++	+	-	+	-	-	+++	-	-

Xg: inibição de *X. gardneri*; Pst: inibição de *P. syringae* pv. *tomato*; GRAM: Teste KOH; FLU: produção de pigmentos fluorescentes em meio KB; CAT: produção de catalase; CEL: produção de celulase; AMI: produção de amilase; PEC: produção de pectinase; - = sem zona de inibição/clareamento; + = zona de inibição/clareamento menor 5 mm de diâmetro; ++ = zona de inibição/clareamento entre 5 e 10 mm de diâmetro; +++ = zona de inibição/clareamento maior que 10 mm de diâmetro; ND – cultivar não definida.

4.4 BIOENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA

Para avaliar o potencial dos isolados para a redução da mancha bacteriana causada por *X. gardneri*, foram realizados dois experimentos independentes. Os isolados que apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra *X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato* (ISO043, ISO057 e ISO137) foram selecionados para o experimento de proteção de plantas em condições de casa de vegetação. Já em um segundo experimento, também foram incluídos os isolados ISSO123 e ISO125 que apresentaram forte atividade *in vitro* contra *X. gardneri*.

Figura 9- Severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*) em plantas de tomateiro do 1º experimento, tratadas com suspensões bacterianas dos isolados selecionados *in vitro* devido à atividade antimicrobiana frente a Pst e Xg: ISO057, ISO043 e ISO137 (D.O. 0,6 unidades de absorvância a 600nm).



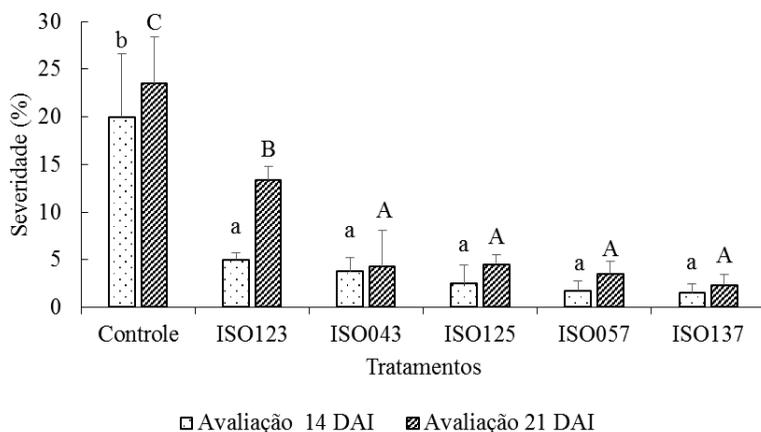
As plantas foram tratadas 48h antes da inoculação do patógeno e as avaliações da severidade da doença feitas aos 7 e 14 dias após a inoculação (DAI). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey. Letras minúsculas referem-se à avaliação realizada aos 7 DAI e letras maiúsculas à avaliação realizadas aos 14 DAI.

O primeiro experimento foi realizado entre os meses de outubro e novembro/2016, com temperaturas médias mínimas em torno de 19 °C e máximas em torno de 25°C. Já o segundo experimento foi realizado entre os meses de dezembro/2016 e janeiro/2017 com temperaturas médias mínimas em torno de 23 °C e máximas em torno de 36 °C.

A Figura 9 mostra os resultados do primeiro experimento com os dados de severidade da mancha bacteriana de duas avaliações realizadas aos 7 e aos 14 dias após a inoculação de *X. gardneri*. No primeiro experimento todos os endofíticos testados (ISO043, ISO137 e ISO057) reduziram significativamente a severidade da mancha bacteriana. Houve uma redução média de 83,51% na área necrosada e isso somente foi verificado na avaliação realizada 14 dias após a inoculação do patógeno.

Os resultados obtidos no segundo experimento mostram que os endofíticos ISO043, ISO137, ISO057 e ISO125 reduziram significativamente a severidade da mancha bacteriana, sem diferirem entre si, promovendo uma redução média de aproximadamente 85% na área necrosada. Por outro lado, o isolado ISO123 não foi tão eficaz quanto os demais, reduzindo em torno de 43% a severidade da doença (Figura 10).

Figura 10 - Severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*) em plantas de tomateiro do 2º experimento, tratadas com suspensões bacterianas dos isolados selecionados *in vitro* devido à atividade antimicrobiana frente a Pst e Xg (ISO057, ISO043 e ISO137) e devido à alta capacidade inibitória de Xg (ISO125 e ISO123) (D.O. 0,6 unidades de absorvância a 600nm).



As plantas foram tratadas 48h antes da inoculação do patógeno e as avaliações da severidade da doença feitas aos 14 e 21 dias após a inoculação (DAI). Barras de erros indicam o desvio padrão. Barras seguidas com letras distintas indicam diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey. Letras minúsculas referem-se à avaliação realizada aos 14 DAI e letras maiúsculas à avaliação realizadas aos 21 DAI.

Analisando os gráficos das Figuras 9 e 10, na avaliação realizada após 14 dias da inoculação do patógeno, é possível verificar que a severidade da mancha bacteriana na testemunha foi maior nas condições do 2º experimento do que nas condições do 1º experimento.

Os resultados de redução da severidade média obtidos para os tratamentos com os isolados endofíticos ISO043, ISO137 e ISO057 se mantiveram iguais nos dois experimentos distintos. Estes resultados indicam que as pequenas variações de temperatura apresentadas nos dois experimentos não afetariam de forma negativa a ação destas bactérias na redução da severidade da mancha bacteriana.

Além disso, no segundo experimento é possível verificar que apesar de ocorrer a evolução da doença na testemunha, os sintomas não evoluíram em plantas tratadas com os isolados selecionados (avaliações aos 14 e 21 DAI).

A única exceção foi o tratamento com isolado ISO123 que diferiu significativamente dos demais tratamentos e da testemunha na avaliação realizada aos 21 dias após a inoculação do patógeno. Este resultado é um indicativo de que o isolado ISO123 não foi tão eficaz quanto os demais em atrasar o desenvolvimento da doença.

Em ambos os experimentos, a mesma cepa bacteriana do gênero *Pseudomonas*, isolada a partir de amostras da parte aérea de planta voluntária de tomateiro e de amostras de raízes (identificadas como ISO043 e ISO137 respectivamente) foi utilizada para tratar a parte aérea de plantas de tomateiro. As Figuras 9 e 10 mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos com o isolado obtido da parte aérea e o isolado obtido da parte radicular em ambos os experimentos.

5 DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE DIFERENTES ÓRGÃOS VEGETAIS E CULTIVARES DE TOMATEIRO

A microbiota endofítica é aquela associada internamente aos tecidos vegetais e em sua maioria composta por bactérias e fungos. Destes, as bactérias são capazes de produzir uma grande diversidade de compostos bioativos com potencial para serem explorados no controle de doenças e na promoção de crescimento vegetal.

O isolamento é a primeira etapa para a obtenção de bactérias endofíticas visando a seleção de biocontroladores e promotores de crescimento vegetal. Um fator-chave no isolamento destas bactérias é o processo de desinfecção superficial (Lodewyckx et al., 2002). De acordo com estes autores, nenhum protocolo de desinfecção superficial resulta na eliminação de bactérias superficiais em 100% das amostras sem o desinfetante penetrar nos tecidos interiores e, assim, reduzir a população de colonizadores internos.

Os protocolos de desinfecção superficial utilizados no presente estudo foram selecionados de acordo com os diferentes tipos de amostras vegetais. Houve uma variação nos tempos e concentrações dos agentes desinfetantes e verificou-se que estes protocolos foram eficazes em eliminar bactérias e fungos epifíticos das amostras de diferentes órgãos vegetais de tomateiro. Apenas uma amostra apresentou crescimento bacteriano em caldo NA, conforme metodologia de contraprova adaptada de Romeiro (2007).

Tan et al. (2006) também validaram o protocolo de desinfecção superficial para amostras de raízes de tomateiro no isolamento de estreptomicetos. Contudo, para poder comprovar a efetividade da desinfecção e que os isolados obtidos eram realmente endofíticos, utilizou-se outra metodologia desenvolvida para o gênero *Streptomyces*. Os isolados obtidos foram avaliados quanto à sobrevivência ao seguinte processo de desinfecção superficial: etanol 70% por 5 min e solução hipoclorito de sódio (0,9% cloro disponível) por 20 min. Por meio desta metodologia, Tan et al. (2006) conseguiram comprovar que os 10 estreptomicetos obtidos eram realmente isolados do interior dos tecidos vegetais e não da superfície das plantas.

Algumas estratégias podem ser adotadas para seleção de amostras vegetais para a obtenção de isolados endófitos com potencial biotecnológico. Diversos estudos já demonstraram maior presença de

endófitos com capacidade antagonista em cultivares resistentes a determinadas doenças vegetais.

No presente estudo foram utilizadas amostras de tecido vegetal de 15 cultivares de tomateiro com diferentes níveis de resistência aos patógenos causadores de manchas foliares, *X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato*. Feng, Li e Liu (2013) investigaram a diversidade bacteriana a partir de plantas de tomate suscetíveis e resistentes a *R. solanacearum* e verificaram que as duas comunidades eram significativamente diferentes uma da outra. A cultivar resistente apresentou maior quantidade de bactérias endofíticas com potencial antagonista do que a cultivar suscetível.

Upreti & Thomas (2015) também verificaram a presença de grande diversidade de bactérias endofíticas associadas às raízes de cultivares resistentes em comparação com as cultivares suscetíveis à infecção por *R. solanacearum*. Entretanto em outro estudo, Tian et al. (2004) isolaram maior número de actinobactérias endofíticas a partir de cultivares de arroz suscetíveis do que a partir de cultivares resistentes a diversos patógenos do arroz, incluindo *X. oryzae* pv. *oryzae*.

Levando em conta os resultados obtidos no atual trabalho, não foi possível observar uma maior proporção de endofíticos antagonistas obtidos de cultivares resistentes em comparação com as cultivares suscetíveis às bacterioses foliares estudadas. Contudo, para muitas das cultivares utilizadas nos isolamentos apenas a resistência a Pst é conhecida e no caso de Xg, a cultivar não é caracterizada ou é classificada como tolerante.

Além disso, sabe-se que diversos fatores podem afetar a densidade e diversidade de bactérias endofíticas. Estes fatores também devem ser considerados na seleção de amostras vegetais para obtenção de bactérias endofíticas visando seleção de bactérias benéficas a planta. Até na mesma planta pode ocorrer uma variação espacial na diversidade e esta variar de acordo com o órgão vegetal. Em geral há um decréscimo no tamanho de populações endofíticas desde as raízes, passando pelo caule até a parte aérea (LODEWYCKX et al., 2002; ZINNIEL et al., 2002).

Kuklinsky-Sobral et al. (2004) demonstraram alguns fatores que influenciam na diversidade taxonômica e a densidade populacional de bactérias endofíticas associadas à soja. Dentre estes fatores, variações sazonais, fase de crescimento e genótipo da planta, além do tipo de tecido vegetal, influenciam na comunidade endofítica (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

No presente estudo, foi obtido um maior número de isolados endofíticos a partir de amostras da parte aérea. No entanto, o protocolo de

desinfecção superficial de amostras de folhas foi diferente daquele utilizado para as amostras de raiz. Uma hipótese é que o protocolo utilizado na desinfecção de amostras de raiz pode ter sido responsável por eliminar endófitos destas amostras, motivo pelo qual houve um menor número de isolados.

Causas de variações na densidade de bactérias endofíticas já foram atribuídas a interações com o hospedeiro vegetal (espécie, genótipo, tecido), estágio do crescimento e especialização da bactéria, diferentes formas de colonização e a interações antagonistas com outras populações de bactérias (VERMA; GANGE, 2014).

Além disso, sabe-se que a grande maioria das bactérias presentes em amostras ambientais não é capaz de crescer em meios de cultivo usualmente empregados para o isolamento. Motivo pelo qual, o estudo da comunidade bacteriana por métodos de cultivo pode não ser eficaz para avaliar a densidade e, muitas vezes, acaba-se subestimando a diversidade de bactérias (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009). Além disso, já foi demonstrado que variações nos meios de cultivo, condições de crescimento e processamento do tecido vegetal podem resultar em diferentes perfis de isolados bacterianos obtidos (LODEWYCKX et al., 2002).

Segundo Halfeld-Vieira et al. (2004), os micro-organismos presentes nas folhas são pouco explorados, principalmente em comparação com aqueles associados às raízes. Menor ainda é o número de estudos a respeito da microbiota presente em brotos e flores, seja ela endofítica ou epifítica (LINDOW; BRANDL, 2003). Também existem poucos estudos com endófitos obtidos a partir de sementes. No entanto, é grande a influência da microbiota presente na espermosfera na sanidade vegetal e esta já foi comprovada por práticas como o tratamento de sementes (FERREIRA et al., 2008).

A maioria dos estudos sobre bactérias endofíticas associadas ao tomateiro são com micro-organismos capazes de colonizar a rizosfera (TAN et al., 2006; UPRETI; THOMAS, 2015) e parte aérea (BARRETTI et al., 2009; FENG; LI; LIU, 2013). Por outro lado, o presente estudo também buscou explorar a microbiota presente nas sementes de diferentes cultivares de tomateiro. Além de obter 10 isolados de bactérias endofíticas a partir das raízes e 15 isolados a partir de amostras da parte aérea também foram obtidos 9 isolados a partir de amostras de sementes de tomateiro.

Após o isolamento, características morfológicas e fenotípicas são critérios importantes para diferenciação dos isolados. Ao todo foram obtidos isolados com 11 morfologias diferentes. De acordo com Lindow e Brandl (2003), em geral as bactérias produtoras de pigmentos dominam

a superfície foliar. No presente estudo, foram isoladas 8 bactérias produtoras de pigmentos também internamente aos tecidos vegetais. Estas bactérias foram classificadas como grupos morfológicos B, E e G de acordo com a Tabela 3 (item 3.4.1), sendo quatro destas obtidas a partir de amostra de raiz, três de parte aérea e um isolado de semente.

Sabe-se que as plantas podem ser colonizadas simultaneamente por uma vasta gama de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (LODEWYCKX et al., 2002). Tanto as bactérias Gram-negativas, quanto bactérias Gram-positivas associadas como endófitos, tem sido isoladas a partir tecidos de diversas espécies vegetais (BACON, C.W., WHITE, 2000; VERMA; GANGE, 2014). Como resultado da reação Gram utilizada para caracterização fenotípica de 34 bactérias endofíticas isoladas neste estudo, 21 são Gram-negativas e 13 Gram-positivas.

Algumas famílias de bactérias endofíticas cultiváveis são frequentemente isoladas, dentre elas estão a família Pseudomonadaceae, Burkholderiaceae e Enterobacteriaceae (WEYENS et al., 2009). Dentre as espécies de bactérias frequentemente isoladas a partir das raízes de tomateiro estão: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* e *Ralstonia pickettii* (PASTOR et al., 2012).

5.2 POTENCIAL DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

Após a obtenção e diferenciação dos isolados de bactérias endofíticas, a seleção inicial dos isolados mais promissores pode ser realizada *in vitro* e permite avaliar um grande número de isolados. No entanto, dentre as limitações destes estudos, de acordo com Moura, Romeiro e Neves (1998), está a falta de uma correlação positiva entre a atividade antagonista *in vitro* e a atividade do micro-organismo em condições de cultivo a campo.

Investigou-se o potencial de 34 isolados de bactérias endofíticas para o biocontrole de patógenos foliares do tomateiro por meio de ensaios *in vitro*. Verificou-se que 20 isolados são capazes de inibir o crescimento de *X. gardneri* ou de *P. syringae* pv. *tomato*.

Aysan, Karatas e Cinar (2003) avaliaram o potencial de 71 rizobactérias para o controle de *E. chrysanthemi*. Por meio de ensaios de antibiose *in vitro*, 14 isolados foram capazes de inibir o crescimento do patógeno. Este potencial se confirmou para um dos antagonistas isolados que apresentou um bom nível de proteção contra *E. chrysanthemi* (74%) em ensaios com plantas em condições de casa de vegetação.

No presente trabalho, 4 isolados de bactérias endofíticas foram selecionados por apresentarem atividade antagonista *in vitro* contra os dois patógenos bacterianos causadores de manchas foliares e o seu potencial contra um destes patógenos, *X. gardneri*, foi confirmado na planta. Os isolados ISO043, ISO137, ISO057 e ISO125 promoveram uma redução média de aproximadamente 85% na área foliar necrosada em dois experimentos distintos em condições de casa de vegetação.

Investigando o potencial de bactérias endofíticas, Wilson et al. (2002) mostraram que o isolado de *P. syringae* Cit7 se destacou entre os demais, promovendo uma redução média de 78% na severidade da pinta bacteriana em condições de casa de vegetação. Quando testado sob condições a campo, esse isolado promoveu uma redução média da severidade de 28%.

Em outro estudo, o potencial deste mesmo isolado (*P. syringae* Cit7) foi investigado para o controle da mancha bacteriana do tomateiro causada por *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Byrne et al. (2005) confirmaram também o potencial deste isolado para controle da mancha bacteriana, proporcionando uma redução de 36,4% na severidade da doença em condições de casa de vegetação e de 28,9% em condições a campo.

Muitos pesquisadores já selecionaram micro-organismos *in vitro* mas estes não apresentaram capacidade de controle de doenças em condições *in vivo* (CARRER FILHO; ROMEIRO; GARCIA, 2008). No presente trabalho, entretanto, após uma seleção inicial *in vitro*, 4 dos 5 isolados testados em ensaios com plantas de tomateiro foram capazes de reduzir a severidade da mancha foliar.

Uma estratégia de seleção que pode ser adotada visando selecionar bons antagonistas e em condições próximas da realidade é por meio de ensaios *in vivo*. Halfeld-Vieira et al. (2004) selecionaram através de ensaios com plantas de tomateiro bactérias antagonistas isoladas a partir do filoplano de tomateiro. Estas bactérias, quando aplicadas na parte aérea de plantas de tomateiro foram capazes de reduzir o número médio de lesões por folíolo para os patógenos *P. syringae* pv. *tomato* e *X. vesicatoria* em condições de casa de vegetação.

Contudo, o principal problema relacionado ao desenvolvimento de produtos comerciais a base de micro-organismos para o uso no controle biológico é a variação da efetividade do agente de biocontrole em diferentes locais e épocas de cultivo. No presente estudo, foi possível verificar uma diferença significativa na média da severidade do tratamento controle entre dois experimentos distintos. Um dos motivos desta diferença pode ser em decorrência das condições de temperatura do

1º experimento serem desfavoráveis ao surgimento da doença. Foi possível observar que demorou mais tempo para as plantas do grupo controle no 1º experimento apresentarem uma mesma intensidade de doença em comparação com as plantas do 2º experimento.

Entretanto, as bactérias antagonistas isoladas no presente trabalho foram eficientes em reduzir a severidade da mancha bacteriana em ambos os experimentos. Isto demonstra que estes isolados não foram afetados pelas variações nas condições ambientais verificadas nos experimentos, característica que lhes confere vantagem, sobretudo em condições de campo.

Sabe-se que as bactérias endofíticas, por ocuparem o interior do tecido vegetal, estão menos propensas à exclusão devido a alterações do ambiente externo (aumento da temperatura, escassez de umidade, irradiação UV). Por este motivo, a sua sobrevivência é favorecida e há menor competição por nutrientes com outros micro-organismos (WEYENS et al., 2009).

Por outro lado, o isolado ISO123 não foi tão eficaz quanto os demais, reduzindo em torno de 43% a severidade da doença. Percebeu-se uma diminuição do efeito do isolado ISO123 ao longo do tempo no controle de *X. gardneri*. Esta diminuição pode estar associada a um decaimento da sua população na filosfera, visto que apresentou efeito antibiótico direto frente ao patógeno. Esta diferença foi verificada na avaliação aos 21 dias após a inoculação do patógeno apenas no 2º experimento. Outra possibilidade é a de que este isolado tenha sido afetado pelo aumento da temperatura verificado no experimento 2, o que prejudicaria a sua sobrevivência e este fator afetaria sua eficácia, sobretudo em condições a campo.

Dentre os fatores que afetam a performance destes micro-organismos estão: a compatibilidade entre a planta hospedeira e o micro-organismo, práticas agrícolas, mutações que diminuem a efetividade dos micro-organismos para o biocontrole e efeito das condições ambientais que afetam a sobrevivência e efetividade do agente de biocontrole (TRIGIANO, 2010). Maiores estudos são necessários para verificar a eficácia da aplicação dos isolados obtidos neste trabalho no controle de *X. gardneri* em condições de campo.

Bactérias benéficas associadas às plantas, como as obtidas no presente estudo, apresentam um papel chave na sanidade vegetal. A antibiose devido à produção de metabólitos com ação antimicrobiana é um método importante de biocontrole de doenças vegetais. Estes compostos são responsáveis por limitar a invasão do patógeno no tecido vegetal. A capacidade de produção de antibióticos caracteriza um

mecanismo importante no biocontrole de bactérias fitopatogênicas (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009).

Uma característica importante associada ao antagonismo direto de bactérias endofíticas é a habilidade de produzir peptídeos antibióticos. Os oligopeptídeos podem influenciar de forma negativa na síntese da parede celular de patógenos, estruturas da membrana celular e formação de subunidades ribossômicas (MAKSIMOV; ABIZGIL'DINA; PUSENKOVA, 2011). Outros compostos de origem microbiana que tem ação antibiótica são a amônia e butirólactona (WEYENS et al., 2009).

Dois compostos antimicrobianos originados de bactérias Gram-positivas de dois gêneros frequentemente isolados como endofíticos, *Bacillus* e *Streptomyces* spp. são oligomicina A e kanosamina (COMPANT et al., 2005). Neste estudo 8 isolados de bactérias Gram-positivas apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra Xg e/ou Pst.

Algumas bactérias Gram-positivas possuem vantagens sobre as Gram-negativas com relação às formulações de agentes de biocontrole. Um exemplo disso é a capacidade que bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* para formar esporos. Estes esporos resistentes ao calor, radiação e dessecação conferem uma maior estabilidade às formulações com estes microrganismos (EMMERT J.; HANDELSMAN, 1999)

Entretanto, existem diversos estudos que demonstram o potencial de bactérias endofíticas Gram-negativas do gênero *Pseudomonas* para o controle biológico e promoção do crescimento vegetal. Diversos compostos antibióticos já foram identificados e originalmente produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*: amfisina, 2,4-diacetil-floroglucino, cianureto de hidrogênio, oomicina A, fenazina, pioluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolone e polipeptídeos cíclico como a viscosinamida (ZAGO; DE-POLLI; RUMJANEK, 2000).

De acordo com Zago, De-Polli e Rumjanek (2000), a versatilidade metabólica deste gênero de bactérias contribui para que sejam encontrados em diversos ambientes, como patógenos de plantas, animais e humanos, além de algumas cepas serem associadas à promoção do crescimento vegetal e controle biológico de fitopatógenos.

Dos nove isolados caracterizados como possivelmente do gênero *Pseudomonas* obtidos neste trabalho, cinco apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente a pelo menos um dos patógenos testados. Dois destes isolados de bactérias foram obtidos a partir de amostras de uma planta voluntária de cultivar não identificada mantida em condições de campo (ISO043 e ISO137). Após a caracterização genotípica destes isolados, entretanto, foi possível verificar que os dois possuem o mesmo genótipo (Figura 6 - perfil BOX-PCR).

O fato dos isolados de ISO043 e ISO137 também apresentarem as mesmas características fenotípicas (atividade antimicrobiana, produção de sideróforos, capacidade de solubilizar fosfatos) sustenta a hipótese de que estes isolados obtidos da parte aérea e da parte radicular da mesma planta pertençam a uma mesma cepa bacteriana.

Em um estudo com isolamento de bactérias endofíticas em plantas de canola, verificou-se que determinados gêneros de bactérias estão presentes em toda a planta e não possuem preferência por determinado órgão vegetal. Dentre os gêneros de bactérias com esta característica está o gênero *Pseudomonas* (CROES et al., 2015).

A capacidade de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* em colonizar partes da planta distintas já foi verificada em diversos órgãos vegetais como raiz, caule, flores, folhas, frutos e sementes (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). Lamb, Tonkyn e Kluepfel (1996) estudaram o processo de colonização da rizobactéria *P. aureofaciens* Ps3732RNL11 desde a rizosfera até a parte aérea a partir de 16 espécies de mono e dicotiledôneas. A densidade populacional foi maior nas raízes e atingiu níveis menores na parte aérea. Mesmo assim, a população permaneceu em quantidades estáveis durante o período de testes de 12 a 23 dias.

O mecanismo de entrada de bactérias endofíticas mais amplamente descrito é através de ferimentos nas raízes (COMPANT et al., 2005; GAIERO et al., 2013). Contudo, a entrada de bactérias endofíticas também ocorre pela parte aérea da planta através de aberturas naturais como os estômatos nas folhas e lenticelas nos caules (LODEWYCKX et al., 2002).

A hipótese de que bactérias endofíticas são capazes de penetrar ativamente nos tecidos vegetais já foi demonstrada por Quadt-Hallmann, Kloeppe e Benhamou (1997) em ensaios com plântulas de algodão. Nestes ensaios, plântulas não tratadas como controle estavam livres de endófitos e a presença de bactérias endofíticas nestas plantas, antes da emergência das raízes laterais, pode indicar penetração ativa (HALLMANN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002). A produção de enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases por diversas espécies de bactérias endofíticas também pode ser um indicativo desta capacidade (LODEWYCKX et al., 2002).

Neste estudo, dois isolados obtidos a partir de amostras de sementes das cultivares BRS Nagai e Cereja Rubi foram capazes de produzir enzimas hidrolíticas (amilase e pectinase). Também foi possível verificar a produção de amilase por um isolado obtido de amostras de raiz.

Já os outros isolados produtores de pectinase foram obtidos um da parte aérea e um isolado de raiz de plantas de tomateiro.

A parede celular da planta é uma barreira física natural. Para ter acesso aos conteúdos das células vegetais, muitas bactérias fitopatogênicas produzem várias enzimas que degradam a parede celular, tais como celulases, pectinases e xilanases. A degradação de polissacarídeos da parede celular também pode liberar produtos que desencadeiam respostas de defesa pela planta (CÂNDIDO et al., 2008). Enzimas pécnicas como as pectato liases podem estar envolvidas no processo de formação de sintomas relacionados a podridão mole em plantas, normalmente provocados por bactérias do gênero *Pectobacterium* (TRIGIANO, 2010).

Geralmente, a densidade da população de bactérias endofíticas é menor do que as encontradas no caso de bactérias patogênicas (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A relação simbiótica que os endófitos mantêm com seu hospedeiro depende de um equilíbrio antagonista. Alterações neste equilíbrio podem ser danosas à planta, pois os endófitos presentes em seus tecidos também podem ser patógenos latentes (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

No entanto, são inúmeras as potencialidades do uso de bactérias endofíticas na agricultura. Sabe-se que a produção de sideróforos por micro-organismos da rizosfera auxilia no controle de patógenos no solo e confere vantagem na competição por ferro para as bactérias que os produzem (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; VERMA; GANGE, 2014).

Neste estudo, a produção de sideróforos foi verificada em 70,58% dos isolados obtidos a partir de folhas, raízes e sementes. Em um estudo com bactérias do gênero *Burkholderia* obtidas da rizosfera de tomateiro, todos os isolados foram capazes de produzir sideróforos do tipo hidroxamato em meio CAS (Caballero-Mellado et al., 2007).

A competição por ferro devido à produção de sideróforos é tido como um mecanismo importante de controle, sobretudo no caso de rizobactérias (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009; LI et al., 2012). A supressão de patógenos ocorre indiretamente devido ao estímulo na biossíntese de compostos com ação antimicrobiana. Neste contexto, já foi proposto que a produção de sideróforos pode ser característica comum entre os endofíticos (VENDAN et al., 2010; VERMA; GANGE, 2014).

Considerado um metabólito benéfico à planta, os sideróforos produzidos por bactérias endofíticas estão relacionados à capacidade de promoção do crescimento (VENDAN et al., 2010; VERMA; GANGE, 2014), ao biocontrole e à resistência sistêmica induzida (BAKKER;

PIETERSE; VAN LOON, 2007; BURKETOVA et al., 2015; DUFFY; DÉFAGO; DUFFY, 1999). Por meio de estudos com mutantes de *Pseudomonas putida* WCS358 incapazes de produzir o sideróforo pseudobactina, foi possível demonstrar claramente o seu efeito na ISR (MEZIANE et al., 2005; RAN et al., 2005).

Meziane et al. (2005) estudaram os determinantes produzidos por *P. putida* WCS358 associados à indução de resistência sistêmica em plantas de tomateiro contra *Botrytis cinerea*. Dentre eles, estudou-se o papel do sideróforo pseudobactina e verificou-se que mutantes da bactéria que não produziam o sideróforo foram incapazes de induzir resistência em plantas de tomateiro contra *Botrytis cinerea*. Também verificou-se que o tratamento com pseudobactina purificada foi tão eficiente quanto o uso da bactéria viva na indução de resistência contra o fitopatógeno (MEZIANE et al., 2005)

Em outro estudo, a infiltração em folhas de *Eucalyptus urophylla* com o mesmo isolado de *P. putida* WCS358 ou com a pseudobactina purificada 358 resultaram na redução significativa da murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*. Entretanto, quando aplicado o tratamento com mutante que não produz a pseudobactina, não foi possível observar o mesmo efeito (RAN et al., 2005).

Além do ferro, outros nutrientes quando presentes em baixas quantidades no solo, como nitrogênio e fósforo são limitantes ao crescimento vegetal. O uso de estratégias que visam reduzir a aplicação de adubos e melhorar a microbiota do solo para promover a fixação biológica de nitrogênio, aquisição de fósforo e ferro são importantes para uma agricultura mais sustentável (WEYENS et al., 2009).

Em um estudo com bactérias endofíticas isoladas de folhas, caules e raízes de duas cultivares de soja, Kuklinsky-Sobral et al. (2004) verificaram que 49% dos isolados endofíticos obtidos possuíam a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos. No presente estudo, 50% dos isolados obtidos solubilizaram fosfato inorgânico. Destes isolados, 8 foram obtidos a partir da raiz, 7 obtidos a partir da parte aérea e apenas 2 obtidos de amostras de semente de tomateiro.

Geralmente bactérias com esta capacidade são isoladas do solo rizosférico e não-rizosférico, rizoplano e filoplano por métodos de diluição seriada ou enriquecimento em meio de cultura (KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2009). De acordo com Sharma et al. (2013), no solo, as bactérias com a capacidade de solubilizar fosfatos correspondem de 1 a 50% da população total de bactérias.

Diversas espécies de bactérias já foram estudadas devido à capacidade de solubilizar fosfatos e em geral predominam espécies de

bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (SHARMA et al., 2013). A capacidade de solubilizar fosfatos pode ocorrer devido à secreção de fosfatases extracelulares, ou de ácidos orgânicos como o ácido glucônico (WEYENS et al., 2009).

Neste estudo, as bactérias Gram-negativas ISO112 e ISO050 e a bactéria Gram-positiva ISO104 demonstraram elevado potencial para solubilizar fosfatos inorgânicos em comparação com os demais. Além destes, os isolados caracterizados como possivelmente do gênero *Pseudomonas* ISO117, ISO043, ISO137, ISO123 e ISO75 também apresentaram alta capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos.

De Werra et al. (2009) demonstraram que a eficiência em solubilizar fosfato inorgânico da bactéria *P. fluorescens* CHA0 é dependente da sua capacidade de produzir ácido glucônico. Também verificaram a associação entre o metabolismo do ácido glucônico e a produção do composto antifúngico responsável pelo controle biológico do mal-do-pé do trigo causado pelo fungo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

Já foi comprovado o sinergismo entre o metabolismo do ácido glucônico, responsável pela solubilização de fosfatos inorgânicos e a atividade antagonista da cepa *P. fluorescens* CHA0 contra patógenos fúngicos (MAKSIMOV; ABIZGIL'DINA; PUSENKOVA, 2011). Esta habilidade é atribuída à produção de compostos antifúngicos e também à capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos que traz vantagens ao crescimento vegetal em condições limitantes de fosfato (DE WERRA et al., 2009).

No presente trabalho, é possível selecionar isolados que somente possuem a habilidade de solubilizar fosfatos inorgânicos e que colonizam as folhas (ISO127) ou as raízes (ISO065). Há também isolados capazes de produzir sideróros obtidos a partir de amostras de sementes (ISO084, ISO058), folhas (ISO054) e raízes (ISO098).

Além dos isolados selecionados devido à atividade antimicrobiana direta frente aos dois patógenos causadores de manchas foliares, também é possível selecionar isolados promissores para o biocontrole que possuem tanto a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos quanto a de produzir sideróros. Estes isolados foram obtidos a partir de amostras de folhas (ISO113 e ISO82) e de raízes (ISO133 e ISO128) de plantas de tomateiro.

Ji et al. (2006) verificaram maior capacidade na redução da severidade de doenças foliares bacterianas pela aplicação da bactéria antagonista foliar (*P. syringae* Cit7) em associação com bactérias promotoras de crescimento. Esses autores demonstraram a potencialidade

do uso de uma estratégia de controle integrado por meio da aplicação de bactérias promotoras de crescimento no solo e bactérias com capacidade de induzir resistência sistêmica nas folhas para controlar doenças foliares como a mancha e a pinta bacteriana.

Apesar de não diferir dos outros três isolados em termos de controle da mancha bacteriana, a cepa caracterizada como possivelmente do gênero *Pseudomonas* (ISO043 e ISO137) apresenta vantagem pois o isolado é capaz de colonizar tanto a parte aérea, quanto a parte radicular. A capacidade de colonizar a parte aérea representa uma vantagem destes isolados em relação aos demais pois colonizam habitat similar ao dos fitopatógenos estudados e, portanto, apresenta maiores chances de ser um agente de biocontrole mais efetivo.

Segundo Guetsky et al. (2002), a estabilidade a campo de um micro-organismo pode estar relacionada a múltiplos mecanismos de ação. Além de inibir diretamente o crescimento de *X. gardneri* e *P. syringae* pv. *tomato*, e reduzir a severidade da mancha bacteriana, os isolados ISO043 e ISO137 são capazes de produzir sideróforos e solubilizar fosfatos inorgânicos, com perspectivas de proporcionarem controle biológico contra várias doenças do tomateiro e promoção de crescimento vegetal.

6 CONCLUSÕES

- Os protocolos de desinfecção adaptados aos diferentes tipos de amostras de tomateiro se mostraram eficazes na eliminação de bactérias e fungos epifíticos proporcionando o crescimento de bactérias endofíticas no meio de cultivo. Por meio de metodologia de contraprova foi possível validar que realmente se tratavam de endófitos;
- A estratégia de isolamento de bactérias endofíticas de 15 cultivares e diferentes órgãos vegetais se mostrou eficaz e proporcionou a obtenção de 34 isolados endofíticos associados ao tomateiro. Destes, aproximadamente 70% dos isolados são produtores de sideróforos, 50% solubilizam fosfato inorgânico e 60% dos isolados apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra ao menos um dos patógenos estudados;
- Dos cinco antagonistas com os melhores resultados nos ensaios de antibiose *in vitro*, quatro tiveram o seu potencial para o biocontrole da mancha bacteriana confirmados por dois experimentos independentes com plantas de tomateiro. Os isolados selecionados proporcionaram uma redução média de aproximadamente 85% na área foliar lesionada nos dois ensaios em condição de casa de vegetação;
- Os isolados ISO043 e ISO137, possivelmente do gênero *Pseudomonas*, se mostraram potenciais agentes de controle biológico contra a mancha foliar causada por *X. gardneri* pois, além de apresentar a vantagem de colonizar tanto a parte aérea, quanto a parte radicular, são capazes de produzir sideróforos e solubilizar fosfatos inorgânicos.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e90402, jan. 2014.
- AGRIOS, G. Plant Pathology 5th Edition. **San Diego: Academic Press**, p. 922, 2005.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7–8, p. 483–495, jan. 2014.
- ANDRADE, C. C. L. et al. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 28–34, 2013.
- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 40, n. 3, p. 417–32, jul. 2009.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 38, n. 2, p. 145–180, 2000.
- ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 63, 2009.
- AYSAN, Y.; KARATAS, A.; CINAR, O. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. **Crop Protection**, v. 22, n. 6, p. 807–811, 2003.
- AZNAR, A. et al. Scavenging iron: A novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores. **Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 2167–2183, 2014.
- BACON, C.W., WHITE, J. F. Microbial Endophytes. **Marcel Dekker Inc., New York**, p. 4–5, 2000.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabisopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, n. January, p. 307–319, 2004.

BAKER, C. M. et al. Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 698–704, 2010.

BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 97, n. 2, p. 239–243, 2007.

BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, 1997.

BARRA, V. R. et al. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 121–126, jun. 2008.

BARRETTI, P. B. et al. Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33, n. SUPPL., p. 2038–2044, 2009.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D. P.; MACHADO, B. D. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1155–1164, 2002.

BHARDWAJ, D. et al. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.

BHATTARAI, K. et al. Differential response of tomato genotypes to *Xanthomonas*-specific pathogen-associated molecular patterns and correlation with bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) resistance. **Horticulture research**, v. 3, n. July, p. 16035, 2016.

BLAINSKI, J. M. L. et al. *Lactobacillus plantarum* Exopolysaccharides Induce Resistance against Tomato Bacterial Spot. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 2, p. 162, 2017.

BLAKEMAN, J. P.; WILLIAMSON, B. **Ecology of plant pathogens**. 1. ed. Wallingford - UK: CAB International, 1994.

BLANCARD, D. **Tomato diseases: Identification, biology and control - A Colour Handbook**. 2. ed. Versailles, France: CRC Press, 2012.

BOTTA, A. L. et al. *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 666–674, 2013.

BRADER, G. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, 2014.

BULGARELLI, D. et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 91–95, 2012.

BURKETOVA, L. et al. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 994–1004, 2015.

BYRNE, J. M. et al. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biological Control**, v. 32, n. 3, p. 408–418, 2005.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5308–5319, 2007.

CÂNDIDO, E. S. et al. *Xanthomonas gardneri* exoenzymatic activity towards plant tissue. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 163–170, 2008.

CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 147–152, 2005.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*.

Tropical Plant Pathology, v. 33, n. 6, p. 457–460, 2008.

CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 4–6, p. 198–208, 2006.

CGEE. **Química verde no Brasil: 2010-2030**. 1. ed. Brasília - DF: Cgee, 2010.

CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2012.

COMPANT, S. et al. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D.; PUPO, M. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, p. 43–47, 2012.

CORREA, O. S. et al. Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 781–786, 2007.

CROES, S. et al. Characterization of the cultivable bacterial populations associated with field grown *Brassica napus* L.: An evaluation of sampling and isolation protocols. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 2379–2392, 2015.

CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; AINSWORTH, T. Development and Evaluation of PCR-Based Diagnostic Assays for the Bacterial Speck and Bacterial Spot Pathogens of Tomato. **Plant Disease**, v. 90, n. 4, p. 451–458, 2006.

DAWWAM, G. E. et al. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 2, p. 195–201, 2013.

DE FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, n. 4, p. 358–364, 1997.

DE MELO, I. S.; DE AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.

DE WERRA, P. et al. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4162–4174, 2009.

DIANESE, A. C.; JI, P.; WILSON, M. Nutritional similarity between leaf-associated nonpathogenic bacteria and the pathogen is not predictive of efficacy in biological control of bacterial spot of tomato. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3484–3491, 2003.

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G.; DUFFY, B. K. Environmental Factors Modulating Antibiotic and Siderophore Biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains. **Appl Environ Microbiol** **65**, v. 65, n. 6, p. 2429–2438, 1999.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism,. **Annual review of phytopathology**, v. 41, p. 501–538, 2003.

EMMERT J., E.; HANDELSMAN, B. Biocontrol of plant disease: a gram-positvie perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 1–9, 1999.

EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2013-2014**, 2014.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MILLER, R. N. G. *Trichoderma*: A Dual Function Fungi and Their Use in the Wine and Beer Industries. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 345–349.

FENG, H.; LI, Y.; LIU, Q. Endophytic bacterial communities in tomato plants with differential resistance to *Ralstonia solanacearum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 15, p. 1311–1318, 2013.

FERREIRA, A. et al. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 1, p. 8–14, 2008.

GAIERO, J. R. et al. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1738–1750, set. 2013.

GAMBACORTA, G. et al. Pesticide residues in tomato grown in open field. **Food Control**, v. 16, n. 7, p. 629–632, 2005.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 43, p. 205–227, 2005.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93–106, 2000.

GUETSKY, R. et al. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 976–985, 2002.

GUO, J. H. et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 29, n. 1, p. 66–72, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. DE A. **Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** [s.l.: s.n.].

HALFELD-VIEIRA, B. DE A. et al. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 638–643, dez. 2004.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops.

Canadian Journal of Microbiology, v. 43, p. 895–914, 1997.

HARDOIM, P. R. et al. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

HERT, A. P. et al. Suppression of the Bacterial Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on Tomato Leaves by an Attenuated Mutant of *Xanthomonas perforans* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3323–3330, 2009.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 624–653, 2000.

HONG, C. E. et al. Isolation of novel leaf-inhabiting endophytic bacteria in *Arabidopsis thaliana* and their antagonistic effects on phytophathogens. **Plant Biotechnology Reports**, v. 9, n. 6, p. 451–458, 2015.

JI, P. et al. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 36, n. 3, p. 358–367, 2006.

JONES, J. B. et al. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. p. 1211–1219, 2000.

JONES, J. B. et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and applied microbiology**, v. 27, n. 6, p. 755–762, 2004.

KARPOUZAS, D. G. et al. Impact of a beneficial and of a pathogenic *Fusarium* strain on the fingerprinting-based structure of microbial communities in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) rhizosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 6, p. 400–408, 2011.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–507, 2008.

KAVITHA, R.; UMESHA, S. Prevalence of bacterial spot in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 991–997, 2007.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. Microbial strategies for crop improvement. **Microbial Strategies for Crop Improvement**, p. 1–358, 2009.

KIMATI, H.; FILHO, A. B.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. [s.l.] CERES, 1995.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–1251, 2004.

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1112–1120, 1996.

LAMBERS, H.; III, F. S. C.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.

LI, S. BIN et al. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* - Induced blight of Anthurium. **Biological Control**, v. 63, n. 1, p. 9–16, 2012.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583–606, 2002.

LOUWS, F. J. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic

Xanthomonas and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2286–2295, 1994.

LOUWS, F. J. et al. Differentiation of Genomic Structure by rep-PCR Fingerprinting to Rapidly Classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 85, p. 528–536, 1995.

LUIZ, C. et al. Polysaccharides from aloe barbadensis reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 387–393, 2012.

MAKSIMOV, I. V.; ABIZGIL'DINA, R. R.; PUSENKOVA, L. I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 333–345, 2011.

MARCUZZO, L. L.; BECKER, W. F.; FERNANDES, J. M. C. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 132–135, 2009.

MARTIN, H.; HAMILTON, V.; KOPITTKER, R. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, v. 88, n. 9, p. 921–924, 2004.

MELLO, S.C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 447–448, 1997.

MEZIANE, H. et al. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 2, p. 177–185, mar. 2005.

MINERDI, D. et al. Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a *Fusarium oxysporum* strain. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1725–1741, 2008.

MOURA, A. B.; DA SILVA ROMEIRO, R.; PRATA NEVES, M. C. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a

Ralstonia solanacearum, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 2065–2072, 1998.

NAIK, P. R. et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC microbiology**, v. 8, p. 230, 2008.

NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate**. [s.l.] Agromisa Foundation, 2006.

NAUE, C. R.; ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Biological control of tomato bacterial spot by seed microbiolization. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 413–416, 2014.

PASTOR, N. et al. Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. **Journal of Environmental Management**, v. 95, n. SUPPL., p. S332–S337, 2012.

PEDLEY, K. F.; MARTIN, G. B. Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. **Annual review of phytopathology**, v. 41, n. 1 mm, p. 215–243, 2003.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; BRENDENCKE, J. W. **Environmental Microbiology: A Laboratory Manual**. [s.l: s.n.].

PEREIRA-CARVALHO, R. D. C.; LORENA, L.; TOBAR, M. **Melhoramento Genético Do Tomateiro Para Resistência a Doenças De Etiologia Viral : Avanços E Perspectivas**. [s.l: s.n.]. v. 22

PITZSCHKE, A. Developmental peculiarities and seed-borne endophytes in Quinoa: Omnipresent, robust bacilli contribute to plant fitness. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–15, 2016.

PODOLICH, O. et al. Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. **Plant and Soil**, p. 367–377, 2014.

POTNIS, N. et al. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 146, 2011.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W.; BENHAMOU, N.

Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 577–582, 1997.

QUEZADO-DUVAL, A. M. et al. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 670–675, 2003.

RADEMAKER, J. L. W. et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 665–677, 2000.

RAN, L. X. et al. Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 113, n. 1, p. 59–70, 2005.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435–443, 2011.

ROMEIRO, R. DA S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: procedimentos**. 1. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2007.

ROMERO, F. M.; MARINA, M.; PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 2, p. 187–194, fev. 2014.

ROMMENS, C. M. et al. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene Pto. **The Plant cell**, v. 7, n. 10, p. 1537–1544, 1995.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.

RUDRAPPA, T. et al. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic

resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Communicative and Integrative Biology**, v. 3, n. 2, p. 130–138, 2010.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1–9, 2008.

RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344–355, 2011.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (EDS.). **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. [s.l.] APS Press, 2000.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, p. 47–56, 1987.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SILVA, H.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. **Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento**, n.38, p. 25, 2006.

SILVA, H. S. A et al. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 6, p. 371–375, 2004.

SMITLEY, D. R.; MCCARTER, S. M. Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and Role of Epiphytic Populations and Environmental Conditions in Disease Development. **Plant Disease**, v. 66, p. 713–717, 1982.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; BAYSAL, Ö. Induction of disease resistance and antioxidant enzymes by acibenzolar-S-methyl against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 85, n. 3, p. 175–181, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, 2003.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. **Biological Control**, v. 17, n. 1, p. 61–72, 2000.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N.; ISAKA, M. Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. **Phytopathology**, v. 72, n. 7, p. 917–918, 1982.

SWAIN, M. R.; RAY, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. **Microbiological Research**, v. 164, n. 2, p. 121–130, 2009.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (EDS.). *Xanthomonas*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993.

TAN, H. M. et al. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1275–1280, 2006.

TIAN, X. L. et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 303–309, 2004.

TRIGIANO, R. N. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. [s.l: s.n.].

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 85–93, 2001.

UPRETI, R.; THOMAS, P. Root-associated bacterial endophytes from *Ralstonia solanacearum* resistant and susceptible tomato cultivars and

their pathogen antagonistic effects. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. April, p. 255, 2015.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243–254, 2007.

VENDAN, R. T. et al. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 559–565, 2010.

VERMA, V. C.; GANGE, A. C. **Advances in Endophytic Research**. New Delhi: Springer India, 2014.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, 1994.

VERSALOVIC, J.; DE BRUIJN, F.; LUPSKI, J. Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes. In: RUIJN, F. J. DE; LUPSKI, J. R.; WEINSTOEK, G. M. (Eds.). . **Bacterial Genomes**. 1. ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 437–454.

VILELA, N. J.; HENZ, G. P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 17, n. 1, p. 71–89, 1 jan. 2000.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 828–40, 2012.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, 2013.

WEYENS, N. et al. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 591–598, 2009.

WHIPPS, J. M. et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, v.

105, n. 6, p. 1744–1755, 2008.

WILSON, M. et al. Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in north america. **Phytopathology**, v. 92, p. 1284–1292, 2002.

XIN, X.-F.; HE, S. Y. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 473–498, 2013.

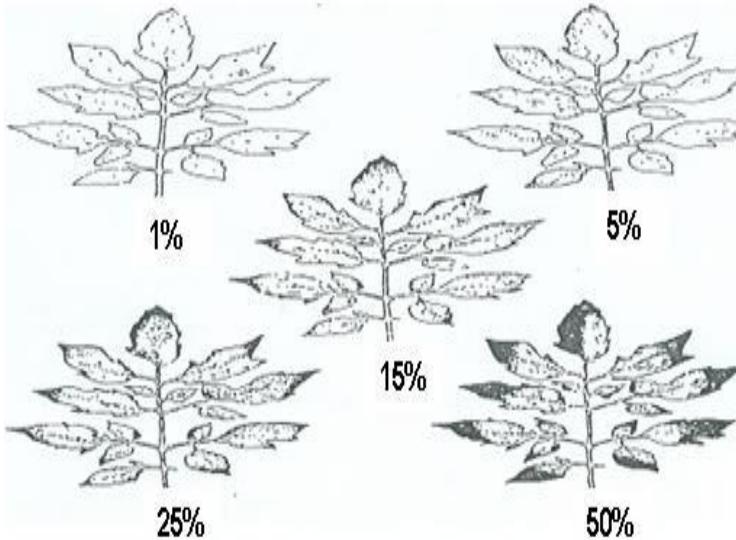
YI, H.-S.; YANG, J. W.; RYU, C.-M. ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. May, p. 122, 2013.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e Biocontroladoras de Fitopatógenos em Sistemas de Produção Agrícola. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, v. Embrapa-CN, p. 32, 2000.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

ANEXO

Anexo 1 - Escala diagramática para mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro (MELLO; TAKATSU; LOPES, 1997) utilizadas para a avaliação dos experimentos em condição de casa de vegetação.



Anexo 2 – Composição dos meios de cultivo utilizados na caracterização dos isolados endofíticos.

Meio King B (KB) – Caracterização da produção de pigmentos fluorescentes

Peptona 20,0 g.L⁻¹

Glicerol 10,0 g.L⁻¹

K₂HPO₄ 1,50 g.L⁻¹

MgSO₄.7 H₂O 1,50 g.L⁻¹

Ágar 16,0 g.L⁻¹

Meio BDA-CaHPO₄ – Caracterização da capacidade de solubilizar fosfato inorgânico

Para o preparo deste meio, para preparar 1L de meio batata dextrose (BDA) suplementado com extrato de levedura (5 g/L), incorporou-se 50 mL de solução 10% K_2HPO_4 e 100 mL de solução 10% $CaCl_2$ previamente esterilizadas com auxílio de filtro de membrana.

Ágar CMC

Para verificar a produção de celulase, 10 μ L de suspensão bacteriana foi depositado em quatro pontos de uma placa contendo Ágar CMC (0,2% $NaNO_3$, 0,1% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$, 0,05% KCl , 0,2% carboximetilcelulose (CMC), 0,02% peptona, e 1,7% ágar).

Meio de cultivo suplementado com amido solúvel 0,2%

Para verificar a produção de amilase (1% extrato de carne, 0,1% Na_2HPO_4 , 0,5% $NaCl$ e 1,5% ágar).

Meio M9 suplementado com extrato de levedura 0,5% e pectina 1%.

O pH do meio foi alterado para 8,0 para caracterizar a produção de pectatolases e para 5,0 para produção de poligalactorunases.

Meio Cromo Azurol S (CAS).

Para o preparo do meio CAS foram adicionados 0,03 g de Cromo Azurol S (CAS) em 25 mL de água destilada (1,21 mg/mL) e misturados com 5 mL de solução férrica (1mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 10mM HCl). Para preparar a solução férrica adicionaram-se 400 μ L de HCl em 5 mL de água deionizada e dissolveu-se 0,00135 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Em seguida, sob agitação, adicionou-se lentamente 0,0364 g de HDTMA em 20 mL de água destilada (1,82 mg/mL). O líquido resultante foi autoclavado a 121°C por 15 min e esfriado até 50°C.

Preparou-se 375 mL de solução de sais dissolvendo-se 0,15 g KH_2PO_4 ; 0,25g $NaCl$; 0,5g NH_4Cl (ajustou-se pH para 5,0). Em seguida adicionou-se 15,24g de piperazina a solução de sais e ajustou-se o pH para 6,8 com KOH . Completou-se o volume para 400 mL e adicionou-se 7,5g de Ágar. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 min e esfriado até 50°C. Preparou-se uma solução casaminoácido 10% (w/v), dissolvendo-se 1,5 g em 13,5 mL de água deionizada. Esta solução foi filtrada com auxílio de filtro de membrana.

Ao final adicionou-se 35 mL da solução III a 400 mL da solução II e em seguida aos 15 mL da solução IV. Adicionou-se vagarosamente a solução I na parede do vidro, agitando para misturar as soluções sem formar espuma.