

**MÉTODOS PARA DETECÇÃO EM SEMENTES DE
TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) E CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***

**FERNANDO MAURO PEREIRA SOARES
BIÓLOGO**

Orientador: Prof. Dr. José Otávio Machado Menten

**Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Agronomia, área de con-
centração: Microbiologia Agrícola.**

**Piracicaba
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1993**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Soares, Fernando Mauro Pereira

Métodos para detecção em sementes de tomate (Lycopersicon
esculentum Mill.) e controle biológico de Pseudomonas syringae pv.
tomato. Piracicaba, 1993.

51p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Bacteriose - Controle biológico 2. Tomate - Semente - Doença
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.642
632.32

**MÉTODOS PARA DETECÇÃO EM SEMENTES DE
TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) E CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***

Fernando Mauro Pereira Soares

Aprovada em: 12/Novembro/1993

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten (orientador)

ESALQ/USP

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado

ESALQ/USP

Dr. Pedro José Valarini

EMBRAPA/cnpma



Prof. Dr. José Otávio Machado Menten
(ORIENTADOR)

**À meus pais,
Josias e Cecília
dedico**

AGRADECIMENTOS

- . À Deus, nosso Pai maior.**

- . Aos meus pais, Josias e Cecília, pelo apoio e esforço para que eu chegasse até este momento.**

- . Ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", sem o qual não poderia realizar esta dissertação.**

- . À CAPES, pela bolsa de estudo obtida durante todo o curso.**

- . À FAPESP, pelo financiamento durante as realizações dos experimentos.**

- . À EMBRAPA (CNPMA), que forneceu espaço físico para realização de parte dos experimentos.**

- . Ao orientador e amigo Prof. Dr. José Otávio Machado Menten pelos bons momentos durante a realização da dissertação.**

- . Ao co-orientador e amigo Dr. Pedro José Valarini, pelos valiosos conselhos e grandes conversas ao longo destes anos.**

- . Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romero, pela grande amizade, a qual fez-me interessar cada vez mais pela área da Fitobacteriologia.**

- . Aos pesquisadores do Instituto Biológico-Estação Experimental de Campinas, na**

peessoa do pesquisador Júlio Rodrigues Neto, o qual despertou-me o interesse pela Bacteriologia Fitopatológica.

. Aos colegas do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelo companheirismo durante todos estes anos.

. Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, e EMBRAPA, sem os quais esta dissertação certamente não seria concluída.

. Às bibliotecárias Kátia e Ellana, da Biblioteca Central da ESALQ, pelas inúmeras "dicas" e apoio durante este período de tempo.

. E, finalizando, agradeço imensamente a todos que me apoiaram e me encorajaram durante fases difíceis no decorrer deste trabalho e, especialmente, aos amigos que cito: Roberto M. de Castro, Paulo Albuquerque, Denise A. Delgado, Amauri Siviero, Marco A. Galli.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.ORIGEM DOS ISOLADOS.....	7
3.1.1.Isolados recebidos.....	7
3.1.2.Obtenção de um isolado.....	8
3.2.IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO.....	9
3.2.1.Testes de patogenicidade.....	9
3.2.2.Testes para determinação da espécie.....	9

3.2.3. Provas bioquímicas para determinação do patovar....	11
3.3. OBTENÇÃO DE SEMENTES DE DIFERENTES CULTIVARES	12
3.4. DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO SEMI-SELETIVO.....	13
3.4.1. Teste do meio com redução da quantidade de proteose peptona.....	13
3.4.2. Adição de um agente halofílico ao meio.....	13
3.4.3. Teste de antibiótico em meio de cultura.....	13
3.4.4. Introdução de um agente antifúngico ao meio.....	15
3.4.5. Teste do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade.....	16
3.5. INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.....	17
3.6. TESTE DE DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRATORAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.....	18
3.7. DETERMINAÇÃO DO MELHOR TEMPO PARA EXTRAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.....	19
3.8. USO DE PLANTAS INDICADORAS COMO ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO DO PATÓGENO PST EM SEMENTES DE TOMATE.....	20
3.9. CONTROLE BIOLÓGICO.....	21

3.9.1. Obtenção dos isolados antagonistas.....	21
3.9.2. Seleção de antagonistas.....	21
3.9.3. Tratamento de sementes visando controle biológico.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO.....	24
4.1.1. Testes de patogenicidade.....	24
4.1.2. Testes para determinação da espécie.....	24
4.1.3. Provas bioquímicas para determinação do patovar.....	24
4.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO SEMI-SELETIVO.....	26
4.2.1. Teste do meio com redução da quantidade de proteose peptona.....	26
4.2.2. Adição de um agente halofílico à composição do meio....	27
4.2.3. Teste de antibióticos em meio de cultura (KB 10g/l).....	28
4.2.4. Constituição final do meio semi-seletivo idealizado.....	28
4.2.5. Teste do meio semi-seletivo quanto à sua supressividade e repressividade.....	30
4.3. TESTE DE DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRATORAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.....	32
4.4. DETERMINAÇÃO DO MELHOR TEMPO PARA EXTRAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.....	35

4.5. USO DE PLANTAS INDICADORAS COMO ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO DE PST EM SEMENTES.....	36
4.6. ESCOLHA DO MÉTODO PARA A DETECÇÃO DO PATÓGENO EM SEMENTES.....	40
4.7. CONTROLE BIOLÓGICO	
4.7.1. Seleção dos antagonistas.....	40
4.7.2. Tratamento de sementes visando controle biológico.....	44
5. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes para determinação de espécie (LOPAT), da bactéria isolada de planta de tomate com sintomatologia típica de mancha bacteriana pequena.....	25
Tabela 2. Testes bioquímicos para patovar (segundo SCHAAD, 1988) da bactéria isolada de planta de tomate com sintomatologia típica de mancha bacteriana pequena.....	25
Tabela 3. Crescimento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> em meio de cultura King B, contendo três níveis de proteose peptona e em meio 523.....	26
Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de NaCl, em meio KB com 10g/l de proteose peptona, no crescimento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>.....	27
Tabela 5. Sensibilidade dos isolamentos de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> a diferentes antibióticos.....	29
Tabela 6. Antibiograma quantitativo indicando a suscetibilidade de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> a diferentes, quantidades de cefadroxil, clindamicina e cefalexna, isoladamente ou conjugados entre si.....	30
Tabela 7. Crescimento de microrganismos em meio semi-seletivo desenvolvido, e em meio básico (KING B.).....	31

Tabela 8. Comparação da repressividade de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> entre os meios básico e semi-seletivo (dados em UFC/ml).....	32
Tabela 9. Comparação da eficiência de diferentes soluções extratoras para sementes contaminadas com <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>.....	34
Tabela 10. Eficiência de quatro processos de extração e detecção de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> e saprófitas em sementes de tomate.....	35
Tabela 11. Efeito de três períodos de tempo para a extração de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> em sementes de tomate.....	36
Tabela 12. Inoculação pelo método de agulhas múltiplas, e 10^2 UFC/ml, para seis cultivares de tomate.....	37
Tabela 13. Inoculação pelo método de agulhas múltiplas, na concentração 10^4 UFC/ml, para seis cultivares de tomate.....	37
Tabela 14. Inoculação pelo método de tesoura, na concentração 10^2 UFC/ml, para as 06 cultivares de tomate.....	38
Tabela 15. Inoculação pelo método de tesoura, na concentração 10^4 UFC/ml, para as 06 cultivares de tomate.....	38
Tabela 16. Avaliação da eficiência de rizobactérias na inibição de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> através do método de pulverização do patógeno sobre colônias vivas de rizobactérias.....	41

Tabela 17. Avaliação da eficiência de rizobactérias na inibição de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> pelo método do uso de clorofórmio.....	42
--	-----------

Tabela 18. Eficiência do tratamento de sementes de tomate, portadoras de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>, com agentes de controle biológico.....	44
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Meio semi-seletivo entre King B e 523 de KADO & HESKETT, mostrando sua supressividade e repressividade.....	33
--	-----------

MÉTODOS PARA DETECÇÃO EM SEMENTES DE TOMATE E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Autor: FERNANDO MAURO PEREIRA SOARES

Orientador: JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

RESUMO

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (PST) é o agente causal da mancha bacteriana pequena do tomateiro. Procurou-se determinar o método mais adequado para detecção de PST em sementes de tomate, através da comparação do uso de plantas indicadoras e um meio semi-seletivo.

Como resultado, determinou-se que o meio semi-seletivo foi mais vantajoso que plantas indicadoras, principalmente quanto a redução do tempo para detecção de PST, sendo de 7-10 dias em plantas indicadoras, contra 36-48 horas em meio semi-seletivo. Este método demonstrou também ser de alta sensibilidade, detectando 10^2 ufc/ml em todas as repetições, uma vez que as cultivares de tomate testadas com o plantas indicadoras (Agrocica 33, Angela, IPA 5, Petomec, Sta. Cruz e Sta Clara), apresentaram sensibilidade de 10^2 ufc/ml, porém não em todas as repetições.

Este meio semi-seletivo foi idealizado a partir do meio básico (King B), reduzindo-se

a quantidade de proteose peptona para 10g/l e adicionando-se 03 antibióticos (clindamicina 100µg/ml; cefadroxil 50µg/ml e cefalexina 50µg/ml), um agente antifúngico (clorotalonil 200µg/ml) e um agente halofílico (cloreto de sódio a 1,5%).

Para o controle biológico foram selecionados 13 antagonistas à PST, testados *in vitro* por 02 métodos (pulverização em placa e teste com clorofórmio), dos quais os 05 melhores foram testados em sementes inoculadas artificialmente com o isolado PST3; estas sementes foram submetidas ao processo de quantificação para comparar o efeito dos antagonistas com um tratamento antibiótico. Os dados indicaram um grande potencial para a utilização de *Bacillus* spp. como controle do agente causal da mancha bacteriana pequena em sementes de tomate.

**METHODS FOR DETECTION IN TOMATO SEEDS
AND BIOLOGICAL CONTROL OF *Pseudomonas*
syringae pv. *tomato***

Author: FERNANDO MAURO PEREIRA SOARES

Adviser: JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

SUMMARY

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (PST) is the casual agent of bacterial speck of tomato. The more adequate method for detection of PST in tomato seeds was searched by comparison of plant indicators and by development of semi-selective medium.

The results indicated that the semi-selective medium was more advantageous than plants indicator, essentially in time reduction for identification that was 7-10 days in plant indicators against 36-48 hours in the semi-selective medium. This method also demonstrated a high sensibility since the cultivars tested as plants indicator (Agrocica 33, Angela, IPA 5, Petomec, Sta. Cruz and Sta. Clara) showed sensibility at 10^2 cfu/ml, but only in some inoculated leaves, while the semi-selective medium showed it at 10^2 cfu/ml in all replicates.

This semi-selective medium was idealized with the utilization of a basic medium (King B) by reduction of the proteose peptone quantity to 10g/l and by addition of three

antibiotics (clindamicine 100µg/ml, cefadroxyl 50µg/ml and cefalexin 50µg/ml), a antifungal agent (chlorothalonil 200µg/ml) and a halofilic agent (sodium chloride at 1,5%).

For the biological control, 13 PST antagonistics were selected and *in vitro* tested by two methods (dish spray and chloroform test) and five of them were further inoculated in seeds artificially inoculated with PST3 isolate. These seeds were submitted to a quantification process to compare the antagonistic effects with a antibiotic treatment. The results indicated a high potential for utilization of *Bacillus* spp. for control of the causal agent of bacterial speck of tomato seeds.

1- INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivado na forma estaqueada e rasteira, para o consumo *in natura* e utilização na indústria, respectivamente, é uma das culturas mais exigentes em cuidados fitossanitários, não só pelo grande número de doenças que a afetam, mas também pela alta capacidade destrutiva e difícil controle destes patógenos. Dentre as doenças de importância econômica para a cultura, destacam-se as bacterioses, entre as quais está a mancha bacteriana pequena, cujo agente causal é *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST).

Nos últimos anos, notou-se um aumento na incidência e severidade da mancha pequena em várias regiões produtoras de tomate em diversos países, sendo que no Brasil, especificamente no Estado de São Paulo, tem-se tornado uma doença de elevada importância para a cultura em áreas irrigadas quanto aos prejuízos ocasionados, devido à queima de folhas, ao desfolhamento da planta, depreciação do fruto para consumo e processamento industrial.

Este aumento da ocorrência da mancha pequena tem sido atribuído a diversos fatores, entre os quais incluem-se as condições ambientais favoráveis, utilização de sementes portadoras de PST, mudas contaminadas, além da ineficiência do controle químico e baixa

resistência genética das cultivares comerciais.

Baseado na importância econômica crescente que a mancha pequena vem assumindo para a cultura do tomateiro e sendo o patógeno transmitido por sementes, o presente trabalho teve o objetivo comparar metodologias de detecção de PST em sementes de tomate, através de isolamento em meio semi-seletivo e inoculação em plantas indicadoras, analisando-as sob vários aspectos, a saber, repressividade, supressividade, especificidade e rapidez, estabelecendo qual a técnica mais viável para ser utilizada em laboratórios de rotina e, possivelmente, em programas de certificação de sementes. Procurou-se, também, buscar medidas alternativas de controle deste patógeno, através da seleção e teste de antagonistas, visando um futuro programa de controle biológico e/ou integrado.

2- REVISÃO DE LITERATURA

A mancha bacteriana pequena do tomateiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al., tem sido considerada uma doença economicamente importante nessa cultura, em várias regiões produtoras de tomate, em diversos países (CHAMBERS & MERRIMAN, 1975; BASHAN *et al.*, 1978; OKON *et al.*, 1979; GOODE & SASSER, 1980; LEITE & MOHAN, 1985). No Brasil, esta doença bacteriana foi observada pela 1ª vez ocorrendo em plantios de tomateiros no Estado de São Paulo (ROBBS, 1962), sendo que nos últimos anos tem-se tornado uma doença de elevada importância para a cultura nesse Estado. A mancha pequena causa queima de folhas e desfolhamento precoce, surgindo em plantas que aparentemente estão sem sintomas no transplântio, quando as condições climáticas se tornam favoráveis (SRISINK & SIVASITHAMPARAM, 1987). Em canteiros a doença pode ser drástica, causando severo desfolhamento, e pode continuar, embora frequentemente com reduzida severidade, em plantas transplantadas no campo (SRISINK & SIVASITHAMPARAM, 1987). Mesmo uma baixa porcentagem de plantas infectadas pode causar severas perdas na cultura, por causa do alto potencial de disseminação de PST sob condições de alta umidade relativa e temperatura entre 20-25°C (SMITLEY & McCARTER, 1982). Em muitos casos, esta doença pode ter passado despercebida ou sido

confundida com outras doenças do tomateiro, principalmente com a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, visto que os sintomas podem ser semelhantes em folhas e frutos adultos (BRYAN, 1933; POHRONEZNY *et al.*, 1979; GOODE & SASSER, 1980; BLANCARD, 1990).

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (PST) pode sobreviver nas sementes, em restos culturais, plantas voluntárias e solo. Esses meios de sobrevivência tem sido considerados como fontes de inóculo no campo (CHAMBERS & MERRIMAN, 1975; BONN *et al.*, 1985; JARDINE *et al.*, 1988). MARIANO (1986) observou que PST sobreviveu epifiticamente por vários períodos sobre raízes e folhagens de tomate e ervas daninhas, sob condições de casa de vegetação e campo.

O aumento da ocorrência do patógeno tem sido atribuído a diversos fatores, entre os quais se incluem as condições climáticas favoráveis, aumento de disseminação, substituição de cultivares resistentes por suscetíveis e a troca de fungicidas cúpricos por ditiocarbamatos para o controle de doenças do tomateiro (DEVASH *et al.*, 1980; BONN, 1980; GOODE & SASSER, 1980).

No Brasil, estudos de avaliações feitas sob condições controladas, apontaram como suscetíveis as cultivares Sakse, Grupo Ângela, Kado, Yokota, Sandra F-5, Ozawa 2 (LEITE & MOHAM, 1985).

Foi determinado que plantas emergindo de sementes externamente portadoras de PST podem desenvolver sintomas da doença e iniciar epidemias no campo, sob condições ambientais favoráveis (BASHAN *et al.*, 1978; DEVASH *et al.*, 1980; YUNIS *et al.*, 1980).

Segundo SCHAAD & WHITE (1974), a detecção de baixa incidência da fitobactéria

nas sementes tem sido difícil, devido ao grande número de bactérias saprófitas, taxonomicamente relacionadas às patogênicas, que as acompanham e interferem com seu crescimento em meios semi-seletivos. Poucos procedimentos foram desenvolvidos para detectar a presença de PST em sementes de tomate. Estes procedimentos baseiam-se no uso de meios enriquecidos com folhas do hospedeiro, uso de bacteriófagos (CUPPELS, 1984), meios seletivos (SAETTLER *et al.*, 1989) e técnicas sorológicas (CASANO, 1985).

Práticas culturais, tais como modificações de sistemas de irrigação para limitar perdas decorrentes da doença (ROTEM & PARTI, 1969), ou o uso de compostos químicos à base de cobre sozinho ou em combinação com outros fungicidas, em tratamento preventivo (CONLIN & Mc CARTER, 1983) não são efetivos para o controle de PST em tomateiro (COLIN & CHALAFIC, 1969).

A expressão controle biológico foi cunhada por H. S. Smith, em 1919, citado por BACH (1964). Está baseada no uso espontâneo, ou dirigido pelo homem, de organismos vivos para o controle de outros organismos parasitas. A primeira notícia do emprego do controle biológico com sucesso foi relatado por Doult *et al.*, citado por BACH (1964). Mas o conceito de controle biológico pode ter uma interpretação mais ampla, quando se aplica à simples modificação biológica do meio ambiente por processos outros que não a introdução de antagonistas do patógeno (BAKER & COOK, 1974).

As bactérias fitopatogênicas constituem importantes organismos capazes de reduzir a produção, podendo atingir em certos casos até 100% de perdas (ROMEIRO, 1988). Assim, o controle eficiente para tais bactérias tem sido amplamente pesquisado. Devido ao aumento rápido do potencial de inóculo e fácil disseminação, o controle de fitobactéria, em muitos

casos, não é eficiente. Por isso, o controle de fitobacterioses pode se constituir em problema sério e de difícil solução. Nos últimos anos, muitas pesquisas tem sido direcionadas para o controle biológico, o qual, em muitos casos, tem apresentado resultados altamente promissores em condições *in vitro*.

Para o controle de fitobacterioses, bactérias antagonicas são microrganismos muito importantes (ROBBS, 1991). Elas podem ultrapassar em número e peso a qualquer outro grupo de microrganismos em solo e sua rapidez de crescimento e habilidade de utilizar diferentes formas de nutrientes, além de produzirem substâncias antimicrobianas, fazem com que elas não sejam comparadas a nenhum outro grupo (BAKER & COOK, 1974).

Espécies de *Pseudomonas* produzem substâncias antimicrobianas efetivas contra outras bactérias (ANURATHA et al, 1987; XU & GROSS, 1986) e certas espécies de *Bacillus*, especialmente *Bacillus subtilis*, produzem antibióticos efetivos contra vários patógenos (CUBETA et al., 1985; RYTTER et al., 1989; UTKHEDE & RAHE, 1983; VALARINI, 1992).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nas dependências dos laboratórios e casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP- Piracicaba-SP e Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa e Monitoramento de Impacto Ambiental (CNPMA/ EMBRAPA), em Jaguariúna-SP.

3.1- ORIGEM DOS ISOLADOS

3.1.1- Isolados recebidos

Quatro isolados foram obtidos mediante solicitações a Instituições de Pesquisa e Ensino, detentoras de bacterioteca no país. Um isolado proveniente de Botucatu-SP (PST3), enviado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Maringoni (UNESP-Botucatu-SP), outros dois isolados (PST2 e PST4), provenientes de Brasília, enviados pelo pesquisador Dr. Carlos Alberto Lopes (CNPQ-EMBRAPA-Brasília-DF) e um isolado (PST5) proveniente de Campinas, do Instituto Biológico-Seção de Bacteriologia Fitopatológica, coordenado pelo Dr. Júlio Rodrigues Neto.

3.1.2- Obtenção de um isolado

Plantas de tomate, originárias da região de Guaira-SP, exibindo sintomas típicos de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST), foram levadas ao laboratório para isolamento e identificação da bactéria, através do método padrão (DHINGRA & SINCLAIR, 1985; ROMEIRO, 1988; SCHAAD, 1988), onde fragmentos do tecido vegetal com sintomas da mancha bacteriana pequena foram colocados sobre uma lâmina de microscópio, junto com uma gota de água destilada, e coberta com lamínula. Na observação, feita sob microscópio ótico com aumento de 100X, foi observada uma exsudação bacteriana, que indicou a possibilidade de ser uma bactéria patogênica.

Outros fragmentos de tecido vegetal, medindo cerca de 1cm de comprimento, também exibindo sintomas, foram colocados em um Becker com álcool a 50% por 30 segundos e, a seguir, transferidos para outro Becker contendo NaClO a 0,5% por 3 minutos. Lavaram-se então as partes em uma placa de Petri com água estéril; os fragmentos foram, então, macerados em água estéril e deixados por 15 minutos para a passagem das bactérias dos tecidos foliares para a água. Decorrido este período, com auxílio de uma alça de platina, foi feita a transferência do macerado para placas de Petri contendo meio King B (KING *et al.*, 1954), através do método de estrias por esgotamento. As placas permaneceram incubadas por um período de 48-72 horas a 25-28°C (SAETTLER *et al.*, 1989). Colônias bacterianas fluorescentes, desenvolvidas nessas condições, foram submetidas a identificação através de testes morfológicos, bioquímicos e de patogenicidade (FAHY & PERSLEY, 1983; KRIEG & HOLT, 1984; LELLIOTT & STEAD, 1987; SCHAAD, 1988), objetivando ser PST.

O isolado obtido foi preservado em óleo mineral e transferências periódicas em tubo contendo meio King B inclinado (TUIITE, 1969; KADO, 1977; FAHY & PERSLEY, 1983; DHINGRA & SINCLAIR, 1985; LELLIOTT & STEAD, 1987; ROMEIRO, 1989b).

O uso de cinco isolados, provenientes de regiões diferentes do Brasil, durante o experimento, fez-se necessário porque cada região produtora de tomate possui suas características peculiares, podendo ocorrer diferenças intrínsecas entre os isolados.

3.2- IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO

3.2.1- Testes de Patogenicidade

O isolado bacteriano obtido foi inoculado em folhas de tomate na fase inicial de crescimento, através de incisão por tesoura previamente mergulhada na suspensão (ROMEIRO, 1976) e as plântulas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas em casa de vegetação e, posteriormente permaneceram na mesma por um período variando de 15-20 dias a 26°C, até a manifestação dos sintomas do patógeno.

3.2.2- Testes para determinação da espécie

Confirmado o gênero *Pseudomonas* pelo teste de patogenicidade, foi realizada uma série de testes bioquímicos, com o intuito de se determinar a espécie do gênero *Pseudomonas* que foi isolada, esperando confirmação para *Pseudomonas syringae*. Estes testes baseiam-se no LOPAT (LELIOTT *et al.*, 1966):

L- Levan: Levan é um polímero sintetizado a partir da frutose, através da divisão

da molécula de sacarose, e é utilizado como fonte de crescimento por algumas espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Erwinia* (LELLIOTT & STEAD, 1987).

Assim, culturas de bactérias em estudo, com 24 horas de idade, foram transferidas para meio ágar nutriente, onde foi adicionado 5% de sacarose e incubadas a 28°C. A avaliação foi feita pela observação 2-3 dias depois. Resultados positivos, indicando produção de Levan, são obtidos mediante surgimento de colônias translúcidas, brilhantes, mucóides e elevadas (LELLIOTT & STEAD, 1987).

O- Oxidase: Este teste foi usado para se detectar a presença do citocromo oxidase C. Tiras de papel Whatman nº 1 foram embebidas numa solução a 1% de tetrametilfenileno diamino dihidroclorato. Em seguida, usando um bastão de vidro, espalhou-se a cultura bacteriana com 24 horas de idade sobre as tiras de papel de filtro. A reação positiva ocorre entre 10-30 segundos, surgindo no papel um tom avermelhado (KOVACS, 1956; LELLIOTT & STEAD, 1987).

P- Podridão de Batata: Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* podem ou não causar podridão em batata. Para isso, culturas do isolado em estudo, com 24 horas de idade, foram inoculados, através de picada com auxílio de estilete, em discos de batata previamente lavados e flambados e, posteriormente, colocados em placas de Petri esterilizadas com o fundo coberto com papel de filtro umedecido e levados à incubação a 28°C por 24 horas (LELLIOTT *et al.*, 1966) onde, após decorrido este período, fez-se abertura das placas para avaliação.

A- Arginina desidrolase: Este teste indica que algumas espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter* podem, em condições de anaerobiose, transformar o substrato

arginina, contida no meio de Thorney (THORNEY, 1960), em citrulina, que posteriormente, através de uma segunda reação, forma ornitina, amônia e dióxido de carbono, permitindo seu crescimento. Para realização do teste, tubos contendo meio de Thorney não inclinado, tendo pH ajustado para 7,18 antes da autoclavagem, foram inoculados com o isolado, com 24 horas de idade, por meio de uma alça de replicagem reta, mergulhada longitudinalmente no tubo. Após a transferência, é feita a selagem do tubo em óleo mineral, garantindo assim a condição de anaerobiose (LELLIOTT & STEAD, 1987); tubos sem a selagem serão para o controle. Após 48 horas de incubação a 28°C é observado o resultado que mostra alteração de cor de amarelo para avermelhado, se positivo, ou inalterado (amarelo) para negativo.

T- Hipersensibilidade em folha de fumo (*Nicotiana tabacum* L.): Dos isolamentos que apresentaram fluorescência, foram obtidas suspensões em solução salina 0,85% e ajustadas para uma concentração de $OD_{600} = 0,3$, conforme LELLIOTT & STEAD (1987). De posse das suspensões, foram feitas inoculações, por meio de injeção, em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). Passadas 24 horas, observou-se o surgimento ou não de uma área necrótica no local da inoculação, indicando ser a reação positiva ou negativa, respectivamente (KLEMENT *et al.*, 1990).

3.2.3- Provas bioquímicas para determinação do patovar

Para identificação do patovar da bactéria em estudo, fez-se necessário lançar mão do meio de Ayers, Rupp & Johnson, citado por LELLIOTT & STEAD (1987), que é composto de $NH_4H_2PO_4$, 1,0g; KCl, 0,2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; Ágar, 12,0g; Água destilada, 1.000ml e púrpura de bromocresol a uma concentração de 0,0016% (peso/volume). Este meio não

apresenta nenhum componente orgânico em sua constituição, por isso os compostos orgânicos podem ser adicionados posteriormente. Os açúcares foram esterelizados por meio de filtração com filtro Millipore (diâmetro do poro de 0,24µm) e adicionados, posteriormente a autoclavagem, quando o meio atingiu uma temperatura de aproximadamente 45°C. Os açúcares testados foram: manitol, adonitol, inositol, sorbitol, eritritol, L-tartarato, D-tartarato, L-lactato. A avaliação foi feita pela visualização do crescimento e alteração da coloração do meio, de azul para amarelo, resultante da alteração do pH neutro para ácido.

3.3- OBTENÇÃO DE SEMENTES DE DIFERENTES CULTIVARES

Foram utilizadas amostras de sementes de tomate da cultivar IPA5, das regiões produtoras de Guaira-SP, Piedade-SP, Monte-Mor-SP e Presidente Prudente-SP, onde tem sido constatada a presença de PST. Deu-se prioridade à esta cultivar, pois é tradicionalmente cultivada nas regiões citadas, procurando assim, estar mais próximo do problema existente. Isso posto, as amostras de sementes de tomate da cultivar IPA5, que tem mostrado maior incidência de bactéria, foram utilizadas para todos os experimentos.

Também foram recebidas sementes de outras cultivares de tomate, através da CATI-Campinas-SP, sendo que cada cultivar correspondia a 01 lote. As cultivares foram: Santa Cruz, Santa Clara, Petomec, Angela Gigante e Agrocica 33. Concentraram-se os estudos nessas cultivares com o objetivo de instalar experimentos visando confirmar qual era suscetível e a possibilidade da utilização destas como plantas indicadoras para determinação da bacteriose em amostras de sementes supostamente contaminadas.

3.4- DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO SEMI-SELETIVO

O primeiro passo é a escolha de um meio básico, onde pode haver o crescimento do patógeno sem afetar sua principal "marca" biológica, que é a fluorescência. Neste caso, o meio escolhido foi King B (KING *et al.*, 1954), que apresenta como principal característica a detecção de pigmentos fluorescentes presentes no microrganismo, se observados sob luz ultra-violeta. Sua composição é: Proteose peptona n° 3, 20,0g; K_2HPO_4 , 1,5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5g; Glicerol, 15,0ml; Ágar, 15,0g; Água destilada, 1.000ml.

3.4.1- Teste do meio com redução da quantidade de proteose peptona.

A proteose peptona n° 3 é de suma importância para a produção de substâncias fluorescentes pela bactéria (KING *et al.*, 1954), mas seu custo atualmente é extremamente elevado. Em razão disso, a redução da quantidade de proteose peptona foi um dos objetivos, tomando sempre o cuidado de manter a característica da bactéria de produzir pigmento fluorescente com a mesma intensidade da quantidade inicial. Para isso, foi feita uma suspensão com os isolados obtidos, a uma concentração aproximada de 10^8 UFC/ml, de onde, através de sucessivas diluições 1:10 fez-se a transferência de 0,1ml das diluições para placas contendo meio King B com 0, 5 e 10g/l de proteose peptona, comparado com a quantidade original (20g/l) como testemunha. Utilizou-se também o meio 523 de Kado & Heskett (KADO & HESKETT, 1970) como outro controle. Contagens das unidades formadoras de colônias foram feitas após 24-36 horas de incubação a 28°C. Os dados, foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.4.2- Adição de um agente halofílico à composição do meio

Cloreto de sódio (NaCl) pode ser considerado um agente inibidor de crescimento bacteriano quando em quantidades mais elevadas, fazendo com que haja desequilíbrio no balanço osmótico da célula. Por esta razão, testaram-se diferentes concentrações de NaCl em meio King B com a quantidade ideal de proteose peptona. As concentrações testadas foram: 1%; 1,5%; 2%; 4% e 6% de NaCl. A avaliação foi feita pela fluorescência e crescimento bacteriano em meio de cultura sólido.

3.4.3- Teste de antibióticos em meio de cultura

Procurando aumentar ainda mais o grau de seletividade do meio, foram realizados antibiogramas com a finalidade de selecionar antibióticos que, adicionados ao meio, não interfeririam com o crescimento de PST e agiriam sobre outros microrganismos, possivelmente contaminantes. Este experimento foi dividido em duas partes: antibiograma qualitativo e antibiograma quantitativo.

Antibiograma qualitativo:

Consiste em selecionar previamente qual(is) antibiótico(s) são incapazes de afetar o crescimento de PST em meio de cultura. Para isso, foram utilizados "kits" de antibióticos (Marca Laborclin), contendo 27 antibióticos a uma determinada concentração ($\mu\text{g/ml}$), vinda como padrão da indústria: Amicacina (30), amoxicilina (30), ampicilina (10), ácido pipemídico (20), canamicina (10), cefadroxil (30), cefalexina (30), cefotaxima (30), cefoxitina (30), clindamicina (30), cloranfenicol (30), eritromicina (15), estreptomicina (10), fosfomicina (30), gentamicina (10), lincomicina (10), neomicina (30), nitrofurantoína (10), norfoxacin

(10), novobiocina (30), oxacilina (10), penicilina (10), polimixina B (300), rifampicina (30), tetraciclina (30), tobramicina (10) e vancomicina (30).

Em placas de Petri, foi colocada uma camada básica de ágar-água, onde posteriormente foi vertido aproximadamente 10ml de meio King B semi-sólido fundente e resfriado a cerca de 48°C, ao qual já havia sido, previamente, adicionado 100µl de suspensão bacteriana desenvolvida em meio KB líquido por 24 horas. Posteriormente, discos de antibióticos foram depositados equidistantes um dos outros e as placas incubadas por 24-36 horas a 28°C. A avaliação consistiu em se determinar o aparecimento ou não de halos de inibição.

Antibiogramas quantitativos:

Os antibiogramas quantitativos têm por finalidade mostrar até que ponto os antibióticos selecionados no antibiograma qualitativo são inócuos para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Neste caso, o procedimento foi semelhante ao realizado no antibiograma qualitativo; entretanto, ao invés de se colocar discos contendo os antibióticos, o meio foi perfurado com o auxílio de um furador de rolhas estéril, de 4mm de diâmetro, onde foi adicionado 10µl de soluções de compostos antimicrobianos, que se mostraram inefetivos a PST, a diferentes concentrações (39, 78, 156, 312 e 625 µg/ml).

3.4.4- Introdução de um agente antifúngico ao meio

Procurando inibir o aparecimento de fungos ao meio nas placas de Petri, quando do isolamento de PST em sementes, adicionou-se ao meio 200µg/ml de clorotalonil, quantidade esta normalmente utilizada, visto que este fungicida é inefetivo contra bactérias

fitopatogênicas, em quaisquer concentrações já estudadas (MARINGONI & KUROSZAWA, 1988).

3.4.5- Teste do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade

Supressividade:

Entende-se por supressividade a capacidade que um meio possui de inibir o crescimento da flora microbiota, que não o organismo que se deseja isolar. Para este experimento, em placas de Petri com o meio idealizado, foram transferidas, pelo método de estrias, culturas de diferentes microrganismos disponíveis, relacionadas à microflora presente no solo, sementes e plantas de tomate. Foram utilizados os fungos *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., e as bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas marginalis* e *Bacillus* sp.

Em um tratamento, foram feitas suspensões em solução salina estéril com cada um destes microrganismos e adicionou-se uma suspensão de PST para posterior transferência para meio KB original e meio semi-seletivo. O outro tratamento consistiu na não incorporação de PST às suspensões, que foram semeadas também em meio KB original e meio semi-seletivo. As placas foram então incubadas a 28°C por 24-36 horas para o surgimento das colônias.

A avaliação consistiu em determinar o crescimento de PST e os microrganismos no meio semi-seletivo e meio KB original, de modo a ficar caracterizada a seletividade do meio desenvolvido.

Repressividade:

Todos os meios seletivos e semi-seletivos apresentam alguma repressividade para o organismo que se deseja isolar (FAHY & PERSLEY, 1983; SOARES *et al.*, 1990). Procurou-se verificar esta ocorrência com o meio desenvolvido neste trabalho e determinar quanto de repressão ocorre, através da determinação de um índice, dividindo-se o número de UFC no meio semi-seletivo pelo número de UFC surgidas nos meios King B e King B modificado.

Culturas puras dos quatro isolados de PST, foram repicadas para quatro tubos com meio King B (KING *et al.*, 1954) inclinado e incubada por 24 horas a 28°C. Posteriormente, foram feitas suspensões em solução salina 0,85% estéril e a partir daí fizeram-se diluições seriadas 1:10 para cada isolado; foram transferidos 100µl da suspensão de cada isolado para meio semi-seletivo e para os outros dois meios básicos. Procedeu-se a contagem de UFC e, a partir dos dados obtidos, calculou-se o fator de repressividade e, por consequência o índice de repressão.

3.5- INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE PST EM SEMENTES DE TOMATE

Amostras de sementes de tomate da cultivar IPA5 foram inicialmente submetidas a uma desinfestação superficial com 0,5% de NaClO por 3 minutos e posterior inoculação artificial com uma suspensão de 10⁴ UFC/ml de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

A técnica de inoculação por infiltração à vácuo consistiu em imergir a amostra de sementes na suspensão do patógeno e colocá-la dentro de uma cuba, onde foi retirado o ar por intermédio de uma bomba de vácuo, a 520mmHg, por 15 minutos. A seguir procedeu-se

a entrada de ar no interior da cuba, permitindo a entrada do patógeno na semente.

De posse de amostras inoculadas artificialmente, foram feitos experimentos visando determinar qual, dentre as soluções extratoras sugeridas, seria a mais eficiente.

3.6- TESTE DE DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRATORAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE

Amostras de aproximadamente 4.000 sementes (10 gramas) da cultivar IPA5, inoculadas artificialmente com 10^4 UFC/ml e não inoculadas, foram divididas em duas sub-amostras; duas delas foram submetidas à trituração através de um equipamento da marca Sorval Omni-Mixer 17150, por 5 minutos. Outras duas sub-amostras não foram trituradas. Foram constituídas amostras de sementes inteiras inoculadas, sementes inteiras não inoculadas, sementes trituradas inoculadas e sementes trituradas não inoculadas.

Todas as sub-amostras de sementes ficaram sob agitação em soluções extratoras, a saber: 50ml de água destilada estéril, 50ml de solução salina (NaCl 0,85%) contendo 0,02% de Tween 20 e 50ml de solução salina tamponada (pH 7,2) a 0,02M. O período de agitação foi de 10-15 minutos para sementes trituradas e 24 horas para sementes inteiras, sendo a 1ª sub-amostra mantida à temperatura de laboratório e a 2ª mantida à temperatura de 5°C.

Em seguida procedeu-se a filtração das amostras em duas camadas de gaze e depois centrifugação a 1.000G por 5 minutos para a separação de partículas maiores. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 12.000G por 15 minutos (SAETTLER, 1989). O sobrenadante obtido foi desprezado e os "pellets" ressuspensos em solução salina

tamponada (pH 7,2), 0,02M e quantificados através do isolamento em meio semi-seletivo e inoculação em plântulas indicadoras nas condições de casa de vegetação; a avaliação consistiu em determinar a severidade nas plantas e contagem do número de colônias de bactérias no meio semi-seletivo, visando definir a melhor solução extratora. Os dados, em UFC/g de semente, foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.7- DETERMINAÇÃO DO MELHOR TEMPO PARA EXTRAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.

Após a realização do ensaio visando determinar a melhor solução extratora, houve a necessidade de escolher um tempo ideal no processo de extração para que houvesse passagem da bactéria, que supostamente estivesse na semente, para a solução extratora.

Utilizaram-se amostras de 4000 sementes (10,0g) inoculadas artificialmente com 10^4 UFC/ml do isolado PST3, sendo cada amostra uma repetição, com três tempos diferentes de extração (15 minutos, uma hora e duas horas). O processo de extração foi semelhante ao citado no item 3.6, utilizando-se a solução extratora escolhida e o melhor método de preparar a amostra.

A avaliação foi feita através da contagem de UFC/g de semente em placas de Petri contendo meio semi-seletivo, após 36-48 horas de incubação a 28°C. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.8- USO DE PLANTAS INDICADORAS COMO ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO DO PATÓGENO PST EM SEMENTES E PLANTAS.

Plantas indicadoras têm sido recomendadas como alternativa para detecção de bactérias, fungos e vírus, pois, além de apresentarem um baixo custo, mostram também uma sintomatologia típica, podendo esta ser facilmente reconhecida (VALARINI, 1990).

Neste ensaio, foram utilizadas 06 cultivares comerciais de plantas de tomate, cujas sementes foram semeadas em 03 vasos (05 plantas por vaso), e as plântulas inoculadas com 25 dias de idade por 02 métodos: (1)agulhas múltiplas, aplicadas na porção central da primeira folha definitiva, e (2)inoculação por incisão com tesoura, onde em cada folha foram feitos 04 cortes, da borda para o centro.

Suspensão de um isolado de PST, ajustado para $OD_{600nm} = 0,3$ (LELLIOTT & STEAD, 1987), foi diluído a 1:10, chegando a se obter suspensões de 10^4 e 10^2 UFC/ml, para proceder a inoculação. A avaliação deu-se após 10 dias de inoculação, com as plantas mantidas nos 03 primeiros dias em câmara úmida, a temperatura de $25^{\circ}C$ e umidade relativa em torno de 90%, sendo atribuídas notas de 0 a 4 tanto na inoculação por agulhas múltiplas como com tesoura, conforme mencionado a seguir:

Escala para agulhas múltiplas: 0- nenhum sintoma; 1- aparecimento de um pequeno halo necrótico em torno das perfurações; 2- progressão deste halo necrótico; 3- halos estão quase que juntos; 4- coalescência dos halos e possível morte da folha.

Escala para incisão com tesoura: 0- nenhum sintoma; 1- surgimento de um halo necrótico em torno do corte; 2- progressão deste halo, mas não há ainda coalescência; 3- quase coalescência; 4- união das regiões afetadas, provocando morte da folha.

Os dados obtidos, em notas, foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.9- CONTROLE BIOLÓGICO

3.9.1- Obtenção de isolados antagonistas.

Uma relação de 13 isolados de *Bacillus* sp., com potencial antagônico, foi utilizada para teste contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Estes isolados, obtidos de raízes de plantas sadias de tomateiro, foram replicados em meio BDA, culturas estas cedidas pelo pesquisador Dr. Pedro José Valarini, do Centro Nacional de Pesquisa e Monitoramento de Impacto Ambiental (CNPMA-EMBRAPA), com resultados prévios já confirmados de atividade antagonística contra PST (VALARINI, 1992). Os isolados obtidos foram: G36B; G1-6; 5G; G4-6; G11-5A; G36C; G8-7; 18G; 20G; 0G; 5PEP; G11-6 e G9-6.

3.9.2- Seleção de antagonistas.

Primeiramente, foram cultivados os isolados, cuja capacidade de antagonismo à PST desejou-se testar, em meio batata dextrose líquido por 24 horas a 25°C. Procedeu-se, então, a transferência desses isolados para placas de Petri contendo meio BDA, depositando uma gota de cada cultura no centro de cada placa.

Dois métodos diferentes foram comparados, com a finalidade de selecionar qual deles é o melhor para a seleção prévia de antagonistas que serão testados no tratamento de sementes. O primeiro método consistiu na pulverização das placas, que já continham os

antagonistas, com suspensões dos quatro isolados de PST (concentração de 10^3 UFC/ml), seguida de incubação em temperatura de 28°C por 24-36 horas (ROMEIRO, 1989a). Transcorrido este período, a avaliação foi realizada pela medição do halo de inibição formado nas placas. No segundo método, as placas, contendo os antagonistas, foram colocadas em câmara de fluxo laminar e invertidas; na tampa foi depositado 1,5 ml de clorofórmio PA, com o intuito de inibir o antagonista, através de seus vapores tóxicos. Decorridos 30 minutos, as placas foram abertas dentro da câmara, para permitir que vapores ainda existentes na placa pudessem ser eliminados. Em seguida, suspensões dos quatro isolados de PST foram adicionadas às placas por meio de pulverização, não havendo, portanto, o crescimento do antagonista quando da sua incubação para o crescimento. Os dados foram obtidos por uma média aritmética das medidas de maior e menor diâmetro do halo de inibição, subtraídas do maior e menor diâmetro da colônia, fazendo com que não houvesse interferência no resultado em razão do crescimento maior ou menor da colônia do antagonista.

Assim, os dados obtidos, foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.9.3- Tratamento de sementes visando controle biológico.

Suspensões bacterianas dos isolados antagônicos selecionados foram cultivados em meio batata dextrose líquido (BD), por 48 horas, para uso no tratamento de sementes.

Em seguida, amostras de 5g de sementes (aprox. 2000) da cultivar IPA5, foram inoculadas artificialmente pelo isolado PST3, pela técnica da infiltração à vácuo, a uma

concentração ajustada para 10^4 UFC/ml e deixadas secar no laboratório à temperatura ambiente. Posteriormente, estas mesmas amostras foram submetidas ao tratamento com os antagonistas seleccionados, através de imersão das sementes em suspensões dos antagonistas por 15 minutos e deixadas para secar por 24 horas, também em laboratório, à temperatura ambiente. Foram utilizadas uma amostra sem tratamento com PST3, outra inoculada sem tratamento com antagonista e outra, como padrão de controle, com antibiótico tetraciclina, seleccionado em antibiogramas.

As sementes dos diversos tratamentos foram submetidas ao processo de extração com a solução extratora seleccionada e o tempo de extração também seleccionado. Realizando estes processos, fez-se diluição das amostras e seu plaqueamento em meio semi-seletivo para verificar se existe controle de *Bacillus* sp. somente pela produção de antibióticos em meio de cultura.

Os dados obtidos, em UFC/g de semente, foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Duncan.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO

4.1.1- Testes de patogenicidade.

A cultura obtida pelo processo de isolamento foi caracterizada como patogênica; decorridos 15 dias após inoculação, surgiram, ao longo das incisões por tesoura, lesões necróticas, indicando ser o teste positivo para patogenicidade.

4.1.2- Testes para determinação da espécie

Na Tabela 1 são mostrados os resultados obtidos pelo teste de LOPAT(LELLIOTT *et al.*, 1966); estes resultados indicaram ser a bactéria isolada pertencente ao gênero *Pseudomonas* e espécie *P. syringae*.

4.1.3- Provas bioquímicas para determinação do patovar.

A Tabela 2 apresenta os resultados da utilização de carboidratos (SCHAAD, 1988), comparando patovar *tomato* com o organismo em estudo. A cultura isolada foi identificada como *P. syringae* pv. *tomato* e nomeada PST1, somada aos outros quatro isolados.

Tabela 1. Testes para determinação de espécie (LOPAT) da bactéria isolada de planta de tomate com sintomatologia típica de mancha bacteriana pequena.

ESPÉCIE	TESTES BIOQUÍMICOS				
	Levan	Oxidase	Podridão batata	Arginina	Hipersensib.
<i>P. syringae</i>	+	-	-	-	+
<i>P. s. savastanoi</i> e	-	-	-	-	-
<i>P. s. delphini</i>					
<i>P. marginalis</i>	+	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i>	-	+	+	+	-
<i>P. tolaasii</i> e algumas saprófitas	-	+	-	+	-
Bactéria em estudo	+	-	-	-	+

Tabela 2. Testes bioquímicos para patovar (segundo SCHAAD, 1988) da bactéria isolada de planta de tomate com sintomatologia típica de mancha bacteriana pequena.

	Bactéria em estudo	pv. <i>tomato</i>
Utilização de:		
Manitol	+	+
Adonitol	-	-
Inositol	+	+
Sorbitol	+	+
Eritritol	-	-
L-tartarato	-	-
D-tartarato	+	+
L-lactato	-	-

4.2- DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO SEMI-SELETIVO.

4.2.1- Teste do meio com redução da quantidade de proteose peptona.

A Tabela 3 apresenta a contagem de colônias em placas, após terem sido incubadas por 24 horas a 28°C, em 03 repetições, comparado-se o meio King B original, o meio King B 10g/l e 5,0g/l e o meio 523 de Kado & Heskett.

Tabela 3. Crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em meio de cultura King B, contendo três níveis de proteose peptona e em meio 523.

MEIO DE CULTURA	UFC/ml diluição 10 ⁻⁸	
KB 20g/l	183,000*	a**
523	180,666	a
KB 10g/l	177,666	a
KB 5g/l	000,000	b

CV = 6,2%

*Médias dos 05 isolados testados, com 03 repetições em cada tratamento.

**Médias seguidas pela mesma letra não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Com base nos resultados da Tabela 3, foi determinado que proteose peptona a 10g/l satisfaz as exigências do meio semi-seletivo em desenvolvimento, uma vez que não houve diferenças significativas com a concentração de proteose peptona a 20g/l, mas foi superior a 5g/l, onde não houve crescimento, por estar abaixo do nível crítico de nutrientes requerido pela bactéria.

4.2.2- Adição de um agente halofílico à composição do meio.

Pelos dados apresentados na Tabela 4, as concentrações de 4% e 6% de NaCl inibiram completamente o crescimento e a fluorescência de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, enquanto que a concentração 2% ocorreu redução considerável de PST; já as concentrações 1% e 1,5% de NaCl não afetaram os cinco isolados, no que se refere a crescimento e fluorescência, se comparados à testemunha (0%). Elegeu-se 1,5% de concentração de NaCl por ser a concentração mais alta em que a bactéria teve seu crescimento e fluorescência normais.

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de NaCl, em meio KB com 10g/l de proteose peptona, no crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

CONCENTRAÇÃO NaCl	CARACTERÍSTICAS DE PST NAS REPETIÇÕES*		
	1	2	3
0% (test)	+++	+++	+++
1%	+++	+++	+++
1,5%	+++	+++	+++
2%	++	++	++
4%	-	-	-
6%	-	-	-

*Médias dos cinco isolados testados

+++ = Crescimento e fluorescência normais

++ = Crescimento e fluorescência pouco afetados

+ = Crescimento e fluorescência bastante afetados

- = Sem crescimento

4.2.3- Teste de antibióticos em meio de cultura (KB 10g/l)

Antibiograma qualitativo

Na Tabela 5 é apresentado a sensibilidade dos cinco isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* à 27 diferentes antibióticos. Os quatro antibióticos em destaque são os que, nos testes, indicaram ser ineficientes à PST nas concentrações originais dos discos.

Antibiograma quantitativo

De posse dos resultados obtidos na Tabela 5, pode-se recomendar três antibióticos (Clindamicina, Cefadroxil e Cefalexina), selecionados no antibiograma qualitativo para o teste em antibiograma quantitativo. A oxacilina, também selecionada, não pode ser incluída nos testes do meio semi-seletivo por não ter sido encontrada disponível no mercado farmacêutico. Os resultados do antibiograma quantitativo estão apresentados na Tabela 6, indicando que as concentrações finais dos antibióticos são as seguintes: Clindamicina, 100µg/ml; Cefadroxil, 50µg/ml e Cefalexina, 50µg/ml, sem que interferissem no crescimento da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

4.2.4- Constituição final do meio semi-seletivo idealizado

Com base nos resultados obtidos, o meio semi-seletivo deve ter a seguinte constituição: proteose peptona N. 3, 10g/l; KH₂PO₄, 1,5g/l; MgSO₄. 7H₂O, 1,5g/l; NaCl, 15g/l; clorotalonil, 200µg/ml; ágar, 15g/l; água destilada, 1000ml; acrescido dos antibióticos cefadroxil, 50µg/ml; cefalexina, 50µg/ml e clindamicina, 100µg/ml.

Tabela 5- Sensibilidade dos isolamentos de *Pseudomonas syringae* pv. tomato a diferentes antibióticos.

ANTIBIÓTICOS	PST1	PST2	PST3	PST4	PST5
Amicacina	S	S	S	S	S
Amoxicilina	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	S	S	S
Ácido Pipemídico	S	S	S	S	S
Canamicina	S	S	S	S	S
Cefadroxil	R	R	R	R	R
Cefalexina	R	R	R	R	R
Cefotaxima	S	R	S	R	S
Cefoxitina	S	S	S	S	S
Clindamicina	R	R	R	R	R
Cloranfenicol	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S
Estreptomicina	R	S	S	S	S
Fosfomicina	S	S	R	S	R
Gentamicina	S	S	S	R	S
Lincomicina	R	S	S	R	S
Neomicina	S	S	S	S	S
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S
Norfoxacin	S	S	S	S	S
Novobiocina	R	S	S	S	S
Oxacilina	R	R	R	R	R
Penicilina	S	S	R	S	R
Polimixina B	S	S	S	S	S
Rifampicina	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S
Tobramicina	S	S	S	S	S
Vancomicina	R	R	S	S	S

PST1 = Isolado de Guaíra; PST2 = Isolado de Botucatu; PST3 = Isolado de Brasília; PST4 = Isolado de Brasília; PST5 = Isolado de Campinas

S = Sensível; R = Resistente

Tabela 6. Antibiograma quantitativo indicando a suscetibilidade de *P. syringae* pv. *tomato* a diferentes quantidades de cefadroxil, clindamicina e cefalexina isoladamente ou conjugados entre si.

TRATAMENTOS*								
Conc. ug/ml	1	2	3	4	5	6	7	8
625	3,66**	-	1,06	3,13	3,4	0,33	1,4	-
312	2,46	-	-	1,13	1,73	-	0,66	-
156	1,93	-	-	1,0	1,33	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-

*1- Cefadroxil + PST; 2- Clindamicina + PST; 3- Cefalexina + PST

4-Cefadroxil+ Clindamicina + PST; 5- Cefadroxil + Cefalexina + PST

6- Cindamicina + Cefalexina + PST ; 7- Cefadroxil + Clindamicina + Cefalexina + PST

8- Testemunha (H₂O dest. + PST)

**Médias de 03 repetições, para os 05 isolados, medindo-se o halo de inibição em cm.

4.2.5- Teste do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade.

Supressividade

A Tabela 7 mostra que o meio semi-seletivo, à excessão de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, demonstrando ter grande ação supressora (Figura 1), sendo recomendado também para isolamentos de PST a partir de frutos e folhas de tomateiro.

Tabela 7. Crescimento de microrganismos em meio semi-seletivo desenvolvido, em meio básico (KING B.)

CULTURAS	Suspensão sem PST		Suspensão com PST	
	MEIO SEMI SELETIVO	MEIO BÁSICO	MEIO SEMI SELETIVO	MEIO BÁSICO
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	+++	-	+++
<i>Aspergillus</i> sp.	-	+++	-	+++
<i>Penicillium</i> sp.	-	+++	-	+++
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	-	+++	-	+++
<i>Erwinia carotovora</i>	-	+++	-	+++
<i>Pseudomonas marginalis</i>	-	+++	-	+++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	-	+++	+++	+++
<i>Bacillus</i> sp.	+	+++	+	+++

(-) = ausência de crescimento

(+) = crescimento mínimo

(++) = crescimento mediano

(+++) = crescimento abundante

Repressividade

A Tabela 8 indica que o meio semi-seletivo tem um fator de repressividade próximo a 1,3 (divide-se maior valor obtido em meio King B com 20 g/l pelo valor obtido no meio semi-seletivo), o que representa um índice em torno de 30%, sendo portanto um índice aceitável, se comparado a outros meios, como 90% para isolamento de *Pseudomonas marginalis* (SOARES *et al.*, 1990).

Obsevou-se também que a análise estatística realizada pelo teste de Tukey não

mostra diferença significativa a nível de 1% entre os meios, sugerindo então sua recomendação.

É importante salientar que, de posse desse índice, é possível determinar UFC crescidas em meio semi-seletivo, comparado à outros meios de cultura utilizados atualmente.

Tabela 8. Comparação da repressividade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* entre os meios básico e semi-seletivo (dados em UFC/ml).

MEIO DE CULTURA	MÉDIAS* (UFC/ml)	
KING B 20g/l	157,666	a**
KING B 10g/l	140,666	a
MEIO SEMI SEL.	120,000	a

CV = 11,2%

* Médias de 03 repetições dos cinco isolados para a diluição 10^8

** Médias seguidas pela mesma letra não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de 1%

4.3- TESTE DE DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRATORAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE.

A eficiência de três soluções extratoras de PST de sementes de tomate pode ser observada na Tabela 9. Verificou-se que a melhor foi tampão fosfato, visto maior recuperação de PST por grama de semente.

Observou-se também que não houve diferença estatística entre as soluções extratoras Água Destilada e Salina+Tween20, que ficaram com valores muito abaixo que a solução extratora Tampão Fosfato.

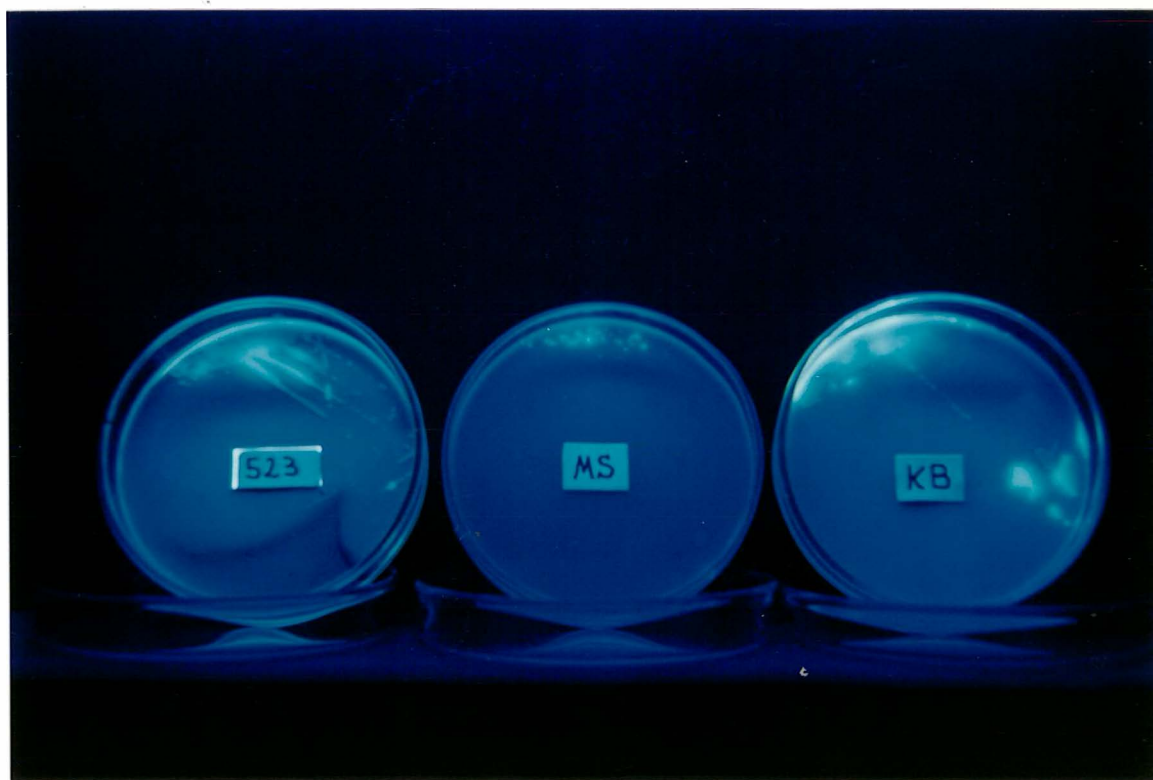


Figura 1- Meio semi-seletivo entre King B e 523 de KADO & HESKETT, mostrando sua supressividade e repressividade.

Tabela 9. Comparação da eficiência de diferentes soluções extratoras para sementes contaminadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

SOLUÇÃO EXTRATORA	UFC/g SEMENTE*	
TAMPÃO FOSFATO	$2,4 \times 10^2$	a**
ÁGUA DESTILADA	$2,0 \times 10$	b
SALINA+TWEEN20	$1,9 \times 10$	b

CV = 18,7%

*Médias de quatro repetições e cinco isolados em UFC

**Médias seguidas pela mesma letra não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Na Tabela 10 é mostrado, em UFC/g de semente, o desempenho dos diferentes métodos a que a semente foi submetida antes do processo de extração propriamente dito. Observou-se que, em maceradas e inoculadas, as unidades formadoras de colônia (UFC) de PST estão em número bem mais reduzido que nas sementes inteiras. O que deveria se esperar é justamente o contrário. A hipótese para este resultado é que durante o processo de extração por 12 horas das sementes maceradas, iniciou-se uma fermentação, provocando produção de substâncias tóxicas às bactérias, ocasionando sua morte. Este argumento torna-se mais sólido pela verificação do odor da amostra de sementes, que tornou-se semelhante ao do vinagre, indicando ocorrência de fermentação.

Tabela 10. Eficiência de quatro processos de extração e detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e saprófitas em sementes de tomate.

TRATAMENTOS	UFC/g DE SEMENTE			
	MEIO DE CULTURA			
	King B		Semi-seletivo	
	PST	Saprófitas	PST	Saprófitas
Sementes inteiras não inoculadas	1,1x10 ^{2**}	1,5x10 ⁴	—	1,7x10 ²
Sementes inteiras inoculadas*	2,3x10 ³	1,5x10 ⁴	3,1x10 ³	1,4x10 ²
Sementes maceradas não inoculadas	—	1,4x10 ²	—	—
Sementes maceradas inoculadas*	9,5x10 ²	9,5x10 ²	8,0x10 ²	—

* Isolado de PST utilizado foi o de número 1

**Contagem de microrganismos em UFC/g de semente

4.4- DETERMINAÇÃO DO MELHOR TEMPO PARA EXTRAÇÃO DE PST EM SEMENTES DE TOMATE

Neste ensaio foi utilizada a solução tampão fosfato salina pH 7,2 a 0,02M como extratora e o método utilizado foi a de trituração das sementes, mesmo este não ter tido resultados satisfatórios nos ensaios do item 4.3. Acredita-se que com sementes trituradas, há um maior contato entre a solução extratora e a semente, obtendo uma maior quantidade de bactérias extraídas. Como o tempo de exposição à solução é bem menor (de 12 horas no ensaio do item 4.3), há a possibilidade de não iniciar o processo de fermentação, facilitando pois, a extração.

Os resultados, apresentados na Tabela 11 indicam que tanto o período de 15

minutos como o de uma hora não diferiram estatisticamente, mas já que o objetivo é um período onde ocorre mais extração, foi selecionado o período de uma hora, visto sua média ser maior. Em duas horas de extração, há uma redução do número de UFC, talvez pela iniciação do processo fermentativo.

Tabela 11. Efeito de três períodos de tempo para a extração de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em sementes de tomate.

PERÍODOS	UFC x 10 ³ /10g SEMENTE*	
15 minutos	3,0	a**
Uma hora	3,6	a
Duas horas	2,6	b

CV = 10,8%

*Médias de quatro repetições para o isolado PST3

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1%

4.5- USO DE PLANTAS INDICADORAS COMO ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO DE PST EM SEMENTES

Nas Tabelas 12, 13, 14 e 15, são mostrados os resultados obtidos com a avaliação no ensaio com plantas indicadoras, indicando a concentração mais adequada, a cultivar mais suscetível e o método de inoculação mais indicado.

Tabela 12. Inoculação pelo método de agulhas múltiplas, na concentração de 10^2 UFC/ml para seis cultivares de tomate.

CULTIVAR	MÉDIAS DE NOTAS*	
IPA 5	0,09415	a**
SANTA CLARA	0.04654	a
SANTA CRUZ	0.00000	a
ANGELA GIGANTE	0.00000	a
AGROCICA 33	0,00000	a
PETOMECC	0,00000	a

CV = 12,7%

*Médias de 18 repetições para o isolado PST 3

**Médias seguidas pela mesma letra não diferam pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Tabela 13. Inoculação pelo método de agulhas múltiplas, na concentração 10^4 UFC/ml, para seis cultivares de tomate.

CULTIVAR	MÉDIAS DE NOTAS*	
IPA 5	0.14285	a**
ANGELA GIGANTE	0.09415	a
SANTA CLARA	0.04654	a
AGROCICA 33	0,00000	a
SANTA CRUZ	0,00000	a
PETOMECC	0,00000	a

CV = 12,7%

*Médias de 18 repetições para o isolado PST 3

**Médias seguidas da mesma letra não diferam pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Tabela 14. Inoculação pelo método de tesoura, na concentração 10^2 UFC/ml, para as 06 cultivares de tomate.

CULTIVAR	MÉDIAS DE NOTAS*	
AGROCICA 33	0.09415	a**
IPA 5	0.09415	a
ANGELA GIGANTE	0.09415	a
SANTA CRUZ	0.04654	a
SANTA CLARA	0,00000	a
PETOMECC	0,00000	a

CV = 12,7%

*Médias de 18 repetições para o isolado PST 3

**Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Tabela 15. Inoculação pelo método de tesoura, na concentração 10^4 UFC/ml, para as 06 cultivares de tomate.

CULTIVAR	MÉDIAS DE NOTAS*	
SANTA CLARA	0.52695	a**
AGROCICA 33	0.38942	ab
PETOMECC	0.34536	ab
IPA 5	0.24333	ab
ANGELA GIGANTE	0.14285	b
SANTA CRUZ	0.14285	b

CV = 12,7%

*Médias de 18 repetições para o isolado PST 3

**Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Na Tabela 12 pode-se observar que o método de agulhas múltiplas, utilizando a concentração de 10^2 UFC/ml, proporcionou a detecção de PST nas cultivares IPA 5 e Santa Clara, não obtendo-se sintomas nas demais cultivares. Mesmo assim, todas as cultivares não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Na Tabela 13, onde é aumentada a concentração para 10^4 UFC/ml, permanecendo o mesmo método de inoculação, nota-se que as cultivares IPA 5, Ângela Gigante e Santa Clara mostraram sintomas, mas também não diferiram estatisticamente das demais cultivares, que não exibiram nenhuma sintomatologia após a inoculação.

Quando efetuou-se a mudança no método de inoculação para a incisão com tesoura, com a concentração ajustada para 10^2 UFC/ml (Tabela 14), foi observado que as variedades IPA 5, Ângela Gigante, Agroclca 33 e Santa Cruz obtiveram notas maiores que zero, mas mesmo assim não diferiram estatisticamente das outras cultivares. Aumentando-se a concentração para 10^4 UFC/ml, foram obtidos valores de notas mais altas, sendo que todas as cultivares exibiram sintomas e a cultivar Santa Clara diferiu estatisticamente das cultivares Ângela Gigante e Santa Cruz, enquanto que Agroclca 33, Petomec e IPA 5 obtiveram valores de notas intermediários.

Por isso, elegeu-se a inoculação por tesoura e a concentração 10^4 UFC/ml como mínima detectável com segurança para testes com plantas indicadoras, podendo esta ser da cultivar Santa Clara, visto sua maior média de notas e estar, na maioria dos testes, exibindo sintomas nas inoculações, mesmo com valores de notas baixos.

Estes valores baixos deve-se, além da sintomatologia propriamente dita, também a perda de algumas repetições, resultando numa distribuição de notas às outras repetições.

A cultivar IPA 5, escolhida para os experimentos, apresentou valores de notas abaixo do esperado, supondo também que alterações de temperatura e umidade em casa-de-vegetação ocorreram que poderiam determinar alterações em sua suscetibilidade.

4.6- ESCOLHA DO MÉTODO PARA A DETECÇÃO DO PATÓGENO EM SEMENTES.

Comparando-se os dados apresentados, o meio semi-seletivo se apresenta como o método mais eficiente na detecção de *Pseudomonas syringae pv. tomato*, por apresentar maior sensibilidade (detecção de 10^2 UFC/ml), alta supressividade, apesar de não possuir especificidade de 100%, tempo menor na detecção (36-48horas) se comparado a plantas indicadoras (10 dias), promovendo um fluxo de amostras de sementes muito mais rápido, além de seu manuseio ser fácil, visto que o meio básico é comum aos laboratórios e os antibióticos nele adicionados podem ser encontrados em qualquer farmácia. Outra vantagem é que em plantas indicadoras há a necessidade de se dispor de um funcionário que mantenha os tomateiros durante qualquer época do ano, inclusive em períodos de variação de temperatura, dificultando inclusive o processo de inoculação e expressão de sintomas.

4.7- CONTROLE BIOLÓGICO

4.7.1- Seleção de antagonistas.

As Tabelas 16 e 17 mostram, respectivamente, os métodos de avaliação de antagonismo de rizobactérias a PST ou seja, utilizando-se o método de pulverização sobre

as colônias dos isolados de *Bacillus* spp. em fase de crescimento, e o método utilizando-se clorofórmio como maneira de matar as células de *Bacillus* spp.

Tabela 16. Avaliação da eficiência de rizobactérias na inibição de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* através do método de pulverização do patógeno sobre colônias vivas de rizobactérias.

RIZOBACTÉRIAS	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO(cm)	
G3-6B	1,500*	a**
G1-6	1,166	ab
5G	0,966	abc
G4-6	0,966	abc
G11-5A	0,950	abc
G3-6C	0,800	abc
G8-7	0,800	abc
18G	0,666	bc
20G	0,600	bc
SPEP	0,566	bc
G11-6	0,533	bc
0G	0,333	c
G9-6	0,000	c

CV = 26,9%

*Médias para três repetições dos cinco isolados

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Tabela 17. Avaliação da eficiência de rizobactérias na inibição de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* pelo método do uso de clorofórmio.

RIZOBACTÉRIAS	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO(cm)	
G4-6	2,366*	a**
G3-6c	2,266	a
G9-6	2,100	a
G11-6	2,066	a
0G	2,000	a
5G	1,900	ab
18G	1,850	ab
G8-7	1,850	ab
G3-6B	1,766	ab
20G	1,700	ab
G11-5A	1,666	ab
G1-6	1,533	ab
5PEP	0,700	b

CV = 19,6

*Médias para três repetições cinco isolados

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1%

Os resultados mostrados nas Tabelas 16 e 17 apontam diferenças de antagonismo entre mesmas rizobactérias, com relação ao tamanho do halo de inibição, nos dois métodos testados. Uma hipótese para isto é que, ao observar o método utilizando clorofórmio, o diâmetro dos halos de inibição é bem maior que o método de pulverização sobre o antagonista vivo; isto pode ser explicado pela presença de vapores produzidos pelo

clorofórmio, que translocariam as substâncias antagônicas no meio de cultura, fazendo com que difundissem mais rapidamente no meio. Entretanto, a ordenação das rizobactérias está alterada, indicando efeito do método na seleção dos antagonistas mais eficientes. Como cada isolado pode produzir diferentes substâncias antagônicas, e estas podem possuir pesos moleculares diferentes, é provável que se deslocaram pelo meio a diferentes velocidades, e por consequência, formando halos de inibição de diferentes diâmetros.

Assim, como este teste *in vitro* é somente um indicativo de qual ou quais microrganismos devem ser selecionados, a metodologia de pulverização de PST sobre colônias vivas de isolados antagonistas pode ser mais indicada, conforme relatado por MARIANO (1993), que cita a rejeição dos testes de seleção *in vitro*, mas, apesar disso, a grande maioria dos trabalhos publicados até o momento, em controle biológico de doenças de plantas, abrange uma seleção inicial em laboratório, e a metodologia de pulverização do patógeno sobre colônias vivas do antagonista promove a não influência de fatores externos, como a translocação de compostos antimicrobianos no meio de cultura pelo uso de clorofórmio, metodologia esta citada por ROMEIRO (1989).

Desta forma, foram selecionados 05 rizobactérias com provável potencial de produzir compostos capazes de controlar PST em sementes de tomate. Os isolados são: G3-6B, G1-6, 5G, G4-6 e G11-5A. Como critério de seleção, utilizaram-se dos dados obtidos na Tabela 16, que apresentam as rizobactérias utilizadas no teste de pulverização sobre colônias vivas, e que apresentam médias das repetições superiores a 0,9cm de diâmetro do halo de inibição.

4.7.2- Tratamento de sementes visando controle biológico.

As cinco rizobactérias pré-selecionadas (G3-6B; G1-6; 5G; G4-6 e G11-5A) foram comparadas, estando os resultados expressos na Tabela 18. Pode-se concluir que o tratamento de semente sadia, diferiu estatisticamente, a nível de 5% no teste de Duncan, dos tratamentos de semente infectada e das rizobactérias G1-6 e 5G. Isto posto, constatou-se que o tratamento de sementes, visando diminuição de PST é viável, através dos isolados G4-6, G3-6B e G11-5A, embora não houvesse diferença estatística, a nível de 5% no teste de Duncan, das testemunhas sadia e tratada com tetraciclina, necessitando pois, de mais estudos visando otimizar os mecanismos de produção de compostos antimicrobianos.

Tabela 18. Eficiência do tratamento de sementes de tomate, portadoras de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, com agentes de controle biológico.

TRATAMENTOS	UFC/g SEMENTE*	
Sem tratamento	1,33x10 ⁸	a**
G1-6	2,12x10 ⁷	a
5G	1,09x10 ⁷	a
G4-6	4,52x10 ⁶	ab
G3-6B	1,49x10 ⁶	ab
G11-5A	2,44x10 ²	ab
Tetraciclina	1,34x10 ²	ab
Sementes sadias	0,00	b

CV = 66,14%

*Média de quatro repetições para o isolado PST 3

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%

5 - CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilita as seguintes conclusões:

a- Desenvolveu-se um meio semi-seletivo com características desejáveis para a detecção de PST em sementes de tomate a um custo reduzido, rapidez na detecção, alta supressividade, baixa repressividade e fácil manuseio.

b- No processo de extração de PST em sementes de tomate, deve-se utilizar sementes maceradas e solução tampão fosfato salina pH 7,2; 0,02M como extrator, pelo período de uma hora, sob agitação contínua a temperatura de 10°C.

c- A seleção de rizobactérias *in vitro*, pelo processo do uso de clorofórmio não é recomendado, pois apresenta grandes diferenças nos resultados, em provável decorrência de vapores de clorofórmio interferirem na translocação de compostos antimicrobianos.

d- Algumas rizobactérias selecionadas, proporcionaram controle semelhante à tetraciclina, para a redução de PST em sementes de tomate, podendo estas espécies serem melhor estudadas para um possível programa de controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em sementes de tomate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANURATHA, C.S. & MANICKAM, S.S.G. *Pseudomonas fluorescens* supress development of bacterial blight (BB) symptoms. **International Rice Research Newsletter**, Manila, **12(1)**: 17, 1987.
- BACH, P. de. **Biological control of insect pests and weeds**. New York, Reinhold, 1964. 844p.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BASHAN, Y.; OKON, Y. ; HENIS, Y. Infection studies of *Pseudomonas tomato* causal agent of bacterial speck of tomato. **Phytoparasitica**, Rehgvot, **6**: 135-43, 1978.
- BLANCARD, D. **Enfermedades del tomate: observar, identificar o cuchor**. Madrid, Ed. Mundi, 1990. 212p.
- BONN, W.G. Incedence and severity of bacterial speck of tomato in South-Western Ontário in 1979. **Plant Disease**, St. Paul, **64**: 586-7, 1980.
- BONN, W.G.; GITAITIS, R.D. ; Mac. NEILL, B.H. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplants shipped from Georgia. **Plant Disease**, St. Paul, **69**: 58-60, 1985.
- BRYAN, M.K. Bacterial speck of tomatoes. **Phytopathology**, St. Paul, **23**: 897-904, 1933.
- CASANO, F.J. Attempts at serological identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* isolates. **Annali dell Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale**, Roma, **10**: 23-8, 1985.

- CHAMBERS, S.C. & MERRIMAN, P.R. Control of *Pseudomonas* tomato in Victoria. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, **26**: 663-897, 1975.
- COLIN, J.E. & CHALAFIK, Z. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. **Plant Disease**, St. Paul, **70**(11): 1048-50, 1986.
- CONLIN, K.C. & Mc. CARTER, S.M. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *in vitro* and controlling bacterial speck. **Plant Disease**, St. Paul, **67**: 639-44, 1983.
- CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. **Plant Disease**, St. Paul, **69**: 506-9, 1985.
- CUPPELS, D.A. The use of pathovar-indicative bacteriophages for rapidly detecting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato leaf and fruit lesions. **Phytopathology**, St. Paul, **74**(8): 891-4, 1984.
- DEVASH, Y.; OKON, Y. ; HENIS, Y. Survival of *Pseudomonas tomato* in soil and seeds. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **99**: 175-85, 1980.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. **Basics plant pathology methods**. Boca Ranton, CRC Press, 1985. 355p.
- FAHY, P.C. & PERSLEY, G.J. **Plant bacterial diseases ; a diagnostic guide**. Sidney, Academic Press, 1983. 393p.
- GOODE, M.J. & SASSER, M. Prevention the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, St. Paul, **64**: 831-4, 1980.

- JARDINE, D.J.; STEPHENS, C.T. ; FULBRIGHT, D.W. Potential sources of initial inoculum for bacterial speck in early planted tomato crops in Michigan: debris and volunteers from previous crops. **Plant Disease**, St. Paul, **72(3)**: 246-9, 1988.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, **60**: 969-79, 1970.
- KING, E.O.; WARD, M.K. ; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, **44**: 301-7, 1954.
- KLEMENT, Z.; RULDOPH, K.; SANDS, D.C. **Methods in phytobacteriology**. Budapest, Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.
- KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocynea* by the oxidase reaction. **Nature**, London, **178**: 703, 1956.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. , ed **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins. 1984. v. 2, 660p.
- LEITE, R.P. & MOHAN, S.K. Mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **10 (03)**: 541-7, 1985.
- LELLIOTT, R.A. & STEAD, D.E. **Methods for the diagnosis of bacterial plant disease**. Oxford, Blakwell Scientific, 1987. 216p.
- LELLIOTT, R.A., BILLING, E., HAYWARD, A.C. A determinative scheme for fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, London, **29**: 470-9, 1966.

- MARIANO, R.L.R. Ecology of three fluorescent pseudomonads that cause foliar diseases of tomato. Athens, 1986. 114p. (PhD -University of Georgia)
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico. IN: LUZ, W.C., ed. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, RAPP, 1993. v.1, p. 369 - 409.
- MARINGONI, A.C & KUROZAWA, C. Efeito de Captan, Clorothalonil, Cicloeximida e Thiram em isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DOIDGE) DYE de tomateiro. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, 14(1/2): 107-16, 1988.
- OKON, Y.; DEVASH, Y.; YUNES, H.; AOK, B.; BASHAN, Y. ; HENIS, Y. Physiology, epidemiology and control of *Pseudomonas tomato*, causal agent of bacterial speck of tomato. **Phytoparasitica**, Rehgvot, 7: 47-8, 1979.
- POHRONEZNY, K.; VOLIN, R.B. ; STALL, R.E. An outbreak of bacterial speck on market tomatoes in South Florida. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, 63: 13-7, 1979.
- ROBBS, C.F. Relação de bactérias patogênicas em hortaliças observadas no Brasil. **Olericultura**, São Paulo, 2: 140-5, 1962.
- ROBBS, C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991. p. 121-33.
- ROMEIRO, R.S. **Identificação de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, Imprensa Universitária, 1976. 58p.
- ROMEIRO, R.S. **Fundamentos de bacteriologia de plantas**. Viçosa Imprensa Universitária, 1988. 50p.
- ROMEIRO, R.S. **Constatação da produção de bacteriocinas por isolamentos de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1989a. 10p.

- ROMEIRO, R.S. **Preservação de culturas bacterianas por dessecamento.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1989b. 7p.
- ROTEM, J. & PARTI, J. Irrigation and plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, 7: 267-88, 1969.
- RYTTER, J.L.; LUKEZIK, F.L.; CRAIG, R.; MOORMAN, G.W. Biological control of Geranium rust by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, 79: 367-70, 1989.
- SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W. ; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other plating material.** St. Paul, APS Press, 1989. 122p.
- SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria** 2. ed. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1988. 158p.
- SCHAAD, N.W. & WHITE, W.C. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, St. Paul, 64: 876-80, 1974.
- SMITLEY, D.R. & Mc. CARTER, S.M. Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. **Plant Disease**, St. Paul, 66: 713-7, 1982.
- SOARES, F.M.P.; ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, J.R.; VENTURA, J.A.; PEREZ F.S. Desenvolvimento de um meio seletivo para *Pseudomonas marginalis*, agente etiológico da queima bacteriana do alho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 15(2): 140, 1990.
- SRISINK, S. & SIVASITHAMPARAM, K. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato seedlings in a nursery. **Plant Protection Quarterly**, Victoria, 2(4): 158-60, 1987.

- THORNEY, M.J. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. **Journal of Applied Bacteriology**, London, **23**: 37-52, 1960.
- TUITTE, J. **Plant pathological methods fungi and bacteria**. Minneapolis, Burgess Publ., 1969. 239p.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Interactions of antagonists and pathogens in biological control of onion white rot. **Phytopathology**, St. Paul, **73**: 890-3, 1983.
- VALARINI, P.J. Método para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Piracicaba, 1990. 167p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP).
- VALARINI, P.J.; FAGLIANI, C.C. ; ALVES, V. Seleção de rizobactérias antagônicas à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 23., Gramado, 1992. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **17**(2): 159, 1992.
- XU, G.W. & GROSS, D.C. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. **Phytopathology**, St. Paul, **76**: 414-29, 1986.
- YUNIS, H.; BASHAN, Y.; OKON, Y. ; HENIS, Y. Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato cause by *Pseudomonas tomato*. **Plant Disease**, St. Paul, **64**: 937-9, 1980.