

ISOLAMENTO E SELEÇÃO MASSAL DE RIZOBACTÉRIAS INDUTORAS DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA À MANCHA-BACTERIANA-PEQUENA DO TOMATEIRO¹

Harllen Sandro Alves Silva²
Reginaldo da Silva Romeiro³

RESUMO

Quinhentas rizobactérias foram isoladas de amostras de solo de rizosfera e rizoplano de tomateiro, provenientes de cinco localidades, pelo método de diluição em placas. Na primeira fase do trabalho, foram preparadas suspensões bacterianas dos antagonistas e utilizadas, individualmente, para a microbiolização de sementes de tomateiro (Santa Cruz Kada) por embebição durante 24 horas, seguindo-se o plantio em copos plásticos contendo solo não-esterilizado, em casa de vegetação. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições. Trinta dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; sete dias após a inoculação, procedeu-se à contagem de lesões. Vinte e oito rizobactérias exibiram aparente atividade de indução de resistência sistêmica, dada a separação espacial entre os antagonistas (rizosfera) e o patógeno (filoplano). Na segunda fase, o experimento foi refeito com as 28 rizobactérias que se destacaram no ensaio anterior para confirmação de resultados, porém com maior número de repetições e em dois ensaios. Adicionalmente, foi verificada a capacidade dos isolados em colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro *in vitro*, por meio de um bioensaio. Os 28 antagonistas mostraram-se colonizadores do sistema radicular e protegeram as plantas de tomate contra o patógeno desafiante. Destacou-se a rizobactéria B101R, que apresentou resultados consistentes em todos os testes.

Palavras-chave: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, controle biológico, rizosfera, colonização radicular.

¹ Parte da tese de doutorado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa - UFV. Aceito para publicação em 10.12.2003.

² Embrapa Meio Ambiente, Cx. P. 69, 13820-000 Jaguariúna, SP. hasalves@cnpma.embrapa.br

³ Departamento de Fitopatologia, UFV, 36570-000 Viçosa, MG. rromeiro@ufv.br

ABSTRACT

ISOLATION AND MASSAL SCREENING OF RHIZOBACTERIA INVOLVED IN INDUCIBLE SYSTEMIC RESISTANCE TO TOMATO BACTERIAL SPECK

Five hundred rhizobacteria were isolated from tomato rhizosphere and rhizoplane soil samples collected from five Brazilian regions. Soil suspensions were prepared in serially diluted saline and placed on a general-purpose culture medium. After incubation, individualized colonies were transferred to slants, performing a set of 500 isolates that were stored at 4°C for further work. In a mass selection protocol, tomato seeds (Santa Cruz Kada) were microbiolized with a cell suspension of every isolate and individually seeded in regular soil in a greenhouse. Thirty days after seeding, seedlings were inoculated with the chosen challenging pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and seven days later the average number of lesions per leaflet was estimated. It was observed that 28 rhizobacteria apparently induced systemic resistance, i. e., the spatial compartmentalization of the microbial components of the interaction. The assay was repeated with a larger number of replicates as results were confirmed. Also, a root colonization bioassay was run with all the isolates. All 28 rhizobacteria showed to be root colonizers according to the chosen bioassay and isolate B101R seemed to be the most efficient in protecting tomato plants against the challenging pathogen.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, biological control, rhizosphere, root colonization.

INTRODUÇÃO

As doenças que acometem o tomateiro são o principal fator limitante para a sua produção em muitas partes do mundo. Cerca de 200 doenças do tomate de diversas causas e etiologias são descritas, sendo o controle da maioria feito com aplicações sistemáticas de defensivos químicos, em muitos casos seguindo um calendário de aplicações semanais. O uso indiscriminado de agroquímicos traz uma série de problemas, como a poluição ambiental, a contaminação dos frutos com resíduos quando o período de carência não é respeitado, o aparecimento de populações de patógenos resistentes e a diminuição das populações de organismos benéficos, dentre outros. Além disso, os custos de produção aumentam significativamente (15, 23, 26).

Atualmente, há crescente pressão por métodos alternativos ao uso de agroquímicos para o controle de fitomoléstias. Dentre eles, o controle biológico vem sendo intensivamente estudado nos últimos anos, principalmente como ferramenta dentro do conceito de integração de táticas de manejo de doenças, apresentando certas vantagens, como baixo custo e agressividade ao ecossistema praticamente inexistente (12, 15, 25).

As rizobactérias, bactérias saprófitas que vivem na rizosfera das plantas colonizando o sistema radicular, destacam-se nos trabalhos

científicos por seu uso no incremento da produção agrícola como promotoras do crescimento de plantas e agentes de biocontrole de patógenos de solo e foliares (3, 4, 9, 11). Sua capacidade em controlar patógenos da parte aérea pode advir da inerente capacidade de induzir resistência sistêmica, que é um estado de aumentada capacidade defensiva desenvolvida pela planta, quando apropriadamente estimulada (16, 27).

As rizobactérias induzem resistência a uma ampla gama de patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides (1, 13, 28), o que é uma vantagem em relação aos controles biológico clássico e químico, em que, na maioria dos casos, o efeito de proteção das plantas acontece contra poucos patógenos.

Os objetivos deste trabalho foram isolar rizobactérias de amostras de solos de rizosfera e de rizopiano de tomateiro, com vistas a se ter uma população de potenciais agentes de biocontrole e proceder à seleção dos melhores antagonistas, com base nos resultados de dois testes: 1) bioensaio em casa de vegetação contra um patógeno bacteriano da parte aérea; e 2) capacidade de colonização do sistema radicular de plântulas de tomateiro *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e seu cultivo

As bactérias, tanto antagonistas quanto o isolado patogênico, foram cultivadas em meio 523 (7), e os actinomicetos em meio extrato de solo-ágar (17). As culturas foram preservadas, por meio de repicagens a cada 120 dias, tubo a tubo, e mantidas a 4°C em refrigerador (18, 29). O patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi obtido da coleção de culturas pertencente à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa.

Isolamento das rizobactérias

Pelo método de diluição em placas, as rizobactérias foram isoladas de amostras de solo de rizosfera e rizopiano de tomateiro sadio de cinco locais. Considerou-se que o solo de rizosfera compunha-se das partículas de solo que se desprendiam facilmente das raízes quando da retirada da planta do campo e que o solo de rizopiano constituía-se das partículas aderidas ao sistema radicular do tomateiro que, posteriormente, foram retiradas pela lavagem vigorosa das raízes (2, 21, 22).

Dez gramas de solo de rizosfera e/ou dez gramas de raízes de plantas de tomateiro com solo aderido foram suspensos em 100 mL de

solução salina (0,85% NaCl) e colocados sob agitação contínua, em agitador rotatório de plataforma, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido este intervalo de tempo, procedeu-se a uma diluição serial fator 10. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição da suspensão de solo de rizosfera e de solo de rizoplano foi semeada em placa de Petri contendo meio 523, espalhada com o auxílio de alça de Drigalsky; a seguir, as placas foram incubadas a 28°C, por 24 horas.

Para o isolamento de actinomicetos, somente amostras de solo de rizosfera foram utilizadas, tendo estas sofrido pré-tratamento térmico de 70°C/72h, de modo a inativar a maioria dos microrganismos não-actinomicetos (14). Além disso, as alíquotas de 100 µL de cada diluição da suspensão de solo foram semeadas em placas de Petri contendo o meio extrato de solo-ágar. As placas foram incubadas a 30°C por sete dias.

Colônias individualizadas que surgiram nas placas foram repicadas em tubos de ensaio (24).

Seleção massal das rizobactérias

A primeira etapa da seleção dos antagonistas foi realizada com base na capacidade das rizobactérias de reduzir o número de pústulas da mancha-bacteriana-pequena do tomateiro, incitada por *P. syringae* pv. *tomato*. Os ensaios foram realizados com a variedade de tomate Santa Cruz Kada. Na segunda etapa, para confirmação dos resultados, os isolados mais promissores foram testados novamente, quanto à capacidade de indução de resistência a *P. syringae* pv. *tomato* e de colonização do sistema radicular de plântulas de tomateiro *in vitro*.

As rizobactérias foram aplicadas via microbiolização de sementes. Aos tubos contendo os antagonistas (24 e 48 horas de crescimento para bactérias e actinomicetos, respectivamente), foi adicionado determinado volume de água de torneira, de modo a cobrir 2/3 do meio de cultura. Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex, obtendo-se uma suspensão homogênea de células. Cada suspensão foi depositada em copos plásticos de 20 mL. As sementes foram imersas nesta suspensão, onde permaneceram por 24 horas em laboratório, ao fim do qual estavam prontas para a semeadura. As sementes imersas em água originaram as plantas que compuseram o tratamento-controle.

Bioensaio de indução de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro

Sementes microbiolizadas foram semeadas em vasos plásticos contendo solo não-esterilizado e mantidos em casa de vegetação (30 ±

2°C). Trinta dias após a semeadura, a parte aérea das plantas foi inoculada com suspensão de células de *P. syringae* pv. *tomato* (OD₅₄₀ = 0,2), de acordo com Romeiro (18). Sete dias após a inoculação, foi estimada a média do número de lesões por folíolo. Os ensaios foram montados no delineamento inteiramente casualizado. Cada rizobactéria foi considerada um tratamento, com três repetições, cada uma consistindo de três plantas.

Devido ao grande número de antagonistas a ser testado, operacionalmente era impossível testar os 500 simultaneamente. Assim, o experimento constou de cinco fases, com 100 antagonistas testados em cada uma. Para tornar possível a comparação entre os resultados de cada grupo de antagonistas, em cada fase, a média do número de lesões por folíolo no tratamento-controle foi considerada 100% de doença. Deste modo, a média do número de lesões de cada tratamento foi comparada com a média de lesões do controle da mesma fase do tratamento. O resultado final foi expresso como percentagem de doença em relação ao controle.

Ensaio de confirmação de resultados

As rizobactérias que proporcionaram níveis de controle acima de 60%, no ensaio em casa de vegetação, foram selecionadas e submetidas novamente a testes para confirmação dos resultados, com algumas modificações. O ensaio foi realizado em casa de vegetação (30 ± 2°C), em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento (rizobactéria) e duas plantas por parcela, sendo repetido uma vez. Procedeu-se à comparação de médias de lesão por folíolo pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Além dos dois ensaios em casa de vegetação, foi realizado um bioensaio de colonização radicular *in vitro*, como ferramenta auxiliar na seleção das rizobactérias consistentemente mais promissoras (20).

Como controle adicional, foram usados três antagonistas de pior desempenho no ensaio em casa de vegetação da primeira etapa.

Bioensaio de colonização do sistema radicular

Sementes de tomate foram esterilizadas superficialmente em etanol (50%) por 30 segundos, depois em NaClO (2%) por 4 minutos. A seguir, foram lavadas em água esterilizada e imersas na suspensão de propágulos dos antagonistas, com 24 e 48 horas de cultivo das rizobactérias e actinomicetos, respectivamente, por 24 horas. Decorrido este intervalo de tempo, as sementes foram transferidas para tubos contendo ágar-água previamente esterilizados (19). Cada tratamento constou de três repetições, com três sementes por tubo em cada uma. Foram realizadas inspeções

diárias até 15 dias após a montagem do bioensaio, para detecção de crescimento bacteriano em torno das raízes. Uma plântula apresentando características de colonização radicular foi suficiente para classificar a rizobactéria como capaz de colonizar raízes de plântulas de tomateiro *in vitro*.

RESULTADOS

Quinhentas rizobactérias foram obtidas dos cinco locais de coleta de amostra de solo (Quadro 1), das quais 100 actinomicetos, diferenciados no isolamento baseado na morfologia da colônia.

QUADRO 1 – Culturas de rizobactérias e actinomicetos obtidas pelo método da diluição em placa, a partir de amostras de solo de rizosfera e rizoplano de plantas de tomateiro		
Identificação da cultura ¹	Local de origem das amostras de solo	
B001R a B040R, B041P a B050P	Horta familiar Sítio Criciúma	Viçosa–MG
A050R a A100R	Horta familiar Sítio Criciúma	Viçosa–MG
B101R a B200R	Plantio comercial de tomate	São Geraldo–MG
B201R a B300R	Horta escolar E. E. Álvaro Amorin	Nanuque–MG
B301R a B350R, B351P a B400P	Horta escolar E. E. Vindilino Lima	Nanuque–MG
B401R a B450R, A451R a A500R	Plantio comercial de tomate	Boa Vista–RR

¹ B = bactéria; A = actinomiceto; R = solo de rizosfera; e P = solo de rizoplano.

A seleção massal em casa de vegetação, para detectar potenciais agentes de biocontrole, apontou 28 rizobactérias capazes de reduzir a severidade da doença de 60 a 79,5%, em relação ao controle. Quando submetidos aos ensaios para confirmação dos resultados, juntamente com os três de pior desempenho, a rizobactéria B101R destacou-se dentre os 28 isolados, confirmando seu desempenho nos dois ensaios (Quadro 2).

Apesar da variabilidade nos resultados dos ensaios de confirmação, houve diferença significativa entre os 28 antagonistas e os três piores do ensaio inicial de seleção, quando se observam as médias do número de lesões por folíolo.

No bioensaio de colonização do sistema radicular *in vitro*, todas as rizobactérias colonizaram as raízes de plântulas de tomateiro em pelo menos uma das três repetições.

QUADRO 2 – Níveis de doença em tomateiros provenientes de sementes microbiolizadas com rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Ensaio 1			Ensaio 2		
Antagonista	Média lesões/folículo	% de doença*	Antagonista	Média lesões/folículo	% de doença*
B101R	1,1	20,5 a	B101R	1,3	29,0 a
B268R	1,1	20,6 a	A064R	1,6	31,9 a
A058R	1,2	22,7 a	A479R	1,7	37,0 a
A479R	1,2	23,1 a	A094R	1,8	38,4 a
B288R	1,3	23,9 a	A080R	1,9	41,8 a
B006R	1,3	24,6 a	A090R	2,0	43,1 a
A068R	1,5	27,9 a	A062R	2,1	45,0 a
B026R	1,5	28,6 a	A092R	2,3	49,7 a
A098R	1,6	29,8 a	A068R	2,3	49,9 a
B212R	1,7	32,8 a	B212R	2,3	50,6 a
B242R	1,8	34,2 b	B115R	2,4	51,7 a
A080R	2,0	37,9 b	A098R	2,4	53,3 a
A094R	2,0	38,1 b	B242R	2,5	53,9 a
A064R	2,1	38,7 b	B006R	2,5	54,2 a
A090R	2,1	39,3 b	B205R	2,5	54,8 b
A067R	2,2	41,7 b	B235R	2,5	54,8 b
B235R	2,3	42,8 b	B026R	2,5	55,2 b
A097R	2,3	42,8 b	A067R	2,5	55,3 b
B115R	2,3	43,8 b	A058R	2,5	55,6 b
B205R	2,3	44,0 b	B268R	2,7	59,1 b
B003R	2,4	46,2 b	B288R	2,7	59,8 b
B023R	2,5	47,6 b	A097R	2,8	60,8 b
A083R	2,7	51,6 b	A083R	2,8	61,4 b
B132R	3,6	67,9 c	B132R	2,9	63,2 b
B182R	3,6	68,8 c	B182R	3,0	65,4 b
A092R	4,0	75,6 c	B302R	3,2	69,5 b
A062R	4,2	79,5 c	B003R	3,5	76,2 b
B302R	5,0	94,3 d	B023R	3,5	76,4 b
CONTROLE	5,3	100,0 d	CONTROLE	4,5	100,0 c
B325R	11,0	206,9 e	B438R	9,31	204,6 d
B438R	11,0	207,5 e	B325R	10,2	225,1 d
B354P	11,5	216,4 e	B354P	11,1	244,8 d

* Tratamentos seguidos de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo agrupamento, pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

DISCUSSÃO

O menor número de actinomicetos isolados pode ser explicado pelo uso de somente um método de isolamento. Moura (14), utilizando-se do método do espalhamento, conseguiu isolar 105 culturas de actinomicetos, em contraste com somente 10 culturas pelo método da diluição, o mesmo empregado neste trabalho.

A microbiolização de sementes foi adequada para a aplicação de antagonista, mesmo porque é carregado um número maior de propágulos do agente de biocontrole (5). Vários trabalhos utilizam esta forma de aplicação de antagonistas (6, 10, 11, 12). O processo de germinação libera grandes quantidades de metabólitos na forma de exsudatos e, desta forma, os microrganismos aplicados na semente têm a oportunidade de ser os primeiros a utilizar estes substratos e, com isso, colonizar a espermosfera (22).

Os 28 antagonistas selecionados colonizaram as raízes, o que não ocorreu com os três piores. Confrontando os dados deste teste com os ensaios em casa de vegetação, conclui-se que o bioensaio de colonização radicular *in vitro* pode ser usado como auxiliar num programa de seleção de agentes de biocontrole. A esterilização superficial das sementes pode ter removido a população microbiana associada à semente, deixando o ambiente livre para o estabelecimento das rizobactérias. Ressalte-se que o meio de cultura, constituído apenas de ágar e água, não suporta o crescimento da maioria dos procariotas, a menos que sejam capazes de utilizar os exsudatos radiculares como fontes de carbono e nitrogênio.

Segundo Kloepper (8), para haver indução de resistência é necessário que haja colonização do sistema radicular da planta por um número suficiente de células de rizobactérias. Esta afirmação aventa a possibilidade de estar acontecendo indução de resistência sistêmica no patossistema testado, considerando a redução da severidade da doença e a habilidade dos antagonistas em colonizar o sistema radicular. Além disso, a separação espacial entre o patógeno e as rizobactérias exclui a possibilidade de antagonismo direto, competição ou hiperparasitismo.

CONCLUSÕES

1) Os 28 isolados de rizobactérias são promissores para o biocontrole de *P. syringae* pv. *tomato*, uma vez que proporcionam bons níveis de controle em casa de vegetação e capacidade de colonizar o sistema radicular do tomateiro.

2) É necessário que testes em campo, com infecção natural, sejam realizados para confirmação da capacidade biocontroladora da rizobactéria B101R contra outros patógenos do tomateiro, avertando a possibilidade de estar ocorrendo resistência induzida, uma vez que ela se manifesta contra uma ampla gama de patógenos.

REFERÊNCIAS

1. ALSTRÖM, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *Journal of General Applied Microbiology*, 37: 495-501, 1991.

2. BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. (ed.). Controle biológico de doenças de plantas. Brasília, EMBRAPA, 1991. 388p.
3. BURRIS, R.H. 100 years of discoveries in biological N₂ fixation. In: Bothe, H.; Bruijin, F.J. & Newton, W.E. (eds.). Nitrogen fixation: hundred years after. New York, VCH Publishers, 1988. p. 21-30.
4. CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; LIU, L. & KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Utkhede, R.S. & Gupta, V.K. (eds.). Management of soil borne diseases. New Delhi, Kalyani Publishers, 1996. p. 165-84.
5. EL-ABYAD, M.; EL-SAYED, M.A.; EL-SHANSHOURY, A.R. & EL-BATANOUNY, N.H. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogens. Canadian Journal of Botany, 71: 1080-6, 1993.
6. HÖKEBERG, M.; GERHARDSON, B. & JOHNSON, L. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse-selected bacteria. European Journal of Plant Pathology, 103: 25-33, 1997.
7. KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology, 60: 669-79, 1970.
8. KLOEPPER, J.W. Host specificity in microbe-microbe interactions. Bioscience, 46: 406-9, 1996.
9. KLOEPPER, J.W. & BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 38: 1219-32, 1992.
10. LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBROEK, M.; BAKKER, P.A.H.M. & SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. European Journal of Plant Pathology, 101: 655-64, 1995.
11. LIU, L.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85: 843-7, 1995
12. MATHRE, D.E. & JOHNSTON, R.H. Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of *Sh2* sweet corn. Plant Disease, 79: 1145-8, 1995.
13. MAURHOFER, M.; KEEL, C.; HAAS, C. & DÉFAGO, G. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology, 84: 139-46, 1994.
14. MOURA, A.B. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1996. 64p. (Tese de doutorado).
15. NORDLUND, D.A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. Biocontrol News and Information, 17: 35N-44N, 1996.
16. PAULITZ, T.C. Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. Phytopathology, 81: 1282-7, 1991.
17. PRAMER, D. & SCHMIDT, E.L. Experimental soil microbiology. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1964. 107p.
18. ROMEIRO, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, Editora UFV, 2001. 297p.
19. ROMEIRO, R.S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H.; MOURA, A.B. & SILVA, H.S.A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção de crescimento de plantas. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 22, Curitiba, 1999. Anais, 1999, p. 255.

20. SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S. & MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. *Journal of Phytopathology*, 151: 42-6, 2003.
21. SIQUEIRA, J.W. & FRANCO, A.A. *Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília, MEC, ESAL, FAEPE, ABEAS, 1988. 236p.
22. STIRLING, G.R. *Biological control of plant parasite nematodes – Progress, problems and prospects*. Mekshom, Redwood Press, 1991. 282p.
23. TAYLOR, I.B. Biosystematics of the tomato. In: Atherton, J. G. & Rudich, J. (eds.). *The tomato crop: a scientific basis for the improvement*. New York, Chapman and Hall, 1986. p. 1-34.
24. TUIITE, J. *Plant pathological methods*, Minneapolis, Burgess Pub. Company, 1969. 239p.
25. TUZUN, S. & KLOEPPER, J.W. Practical application and implementation of induced resistance. In: Hammerschmidt, R. & Kuc, J. (eds.). *Induced resistance to disease in plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 152-68.
26. VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. & CORREIA, L.G. Avaliação fitossanitária da cultura do tomateiro em regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo. In *Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, 25, Gramado, 1992. Anais, 1992, p. 217.
27. VAN LOON, L.C. Induced resistance in plantas and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 753-65, 1997.
28. VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-83, 1998.
29. WILLIAMS, S.T. & WELLINGTON, E.M.H. Actinomycetes. In: Page, A.L.; Miller, R.H. & Keeney, D.R. (eds.). *Methods of soil analysis*. Madison, Soil Science Society of America, 1982. p. 969-87.