



DISSERTAÇÃO

**RIZOBACTÉRIAS
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA
EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS**

FERNANDA DE SOUSA BERNARDES

**Campinas, SP
2006**

**INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
TROPICAL E SUBTROPICAL**

**RIZOBACTÉRIAS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA
SISTÊMICA EM CULTIVOS HIDROPÔNICOS**

FERNANDA DE SOUSA BERNARDES

Orientadora: Sueli dos Santos Freitas

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em
Agricultura Tropical e Subtropical
Área de Concentração
em Gestão de Recursos Agroambientais

Campinas, SP
Abril 2006

FICHA ELABORADA PELO NÚCLEO DE INFORMAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO
DO INSTITUTO AGRONÔMICO - IAC

B517r Bernardes, Fernanda de Sousa.

Rizobactérias na Indução de Resistência Sistêmica em Cultivos
Hidropônicos./ Fernanda de Sousa Bernardes. Campinas, 2006.
58f.

Orientadora: Sueli dos Santos Freitas
Dissertação (Mestrado) – Concentração em Gestão de
Recursos Agroambientais – Instituto Agronômico

1. Rizobactérias – controle biológico 2. Rizobactérias – cultivo
Hidropônicos 3. Plantas – cultivo hidropônico I. Freitas, Sueli dos
Santos II. Título

CDD 632.96



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapira 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br



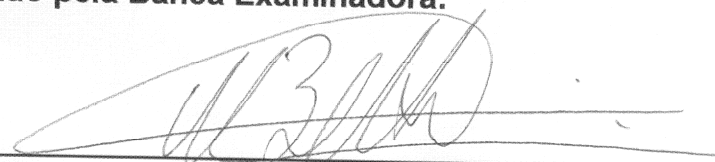
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Rizobactérias na Indução de Resistência Sistêmica em Cultivos Hidropônicos

Aluno(a): Fernanda de Sousa Bernardes
Processo SAA nº 18023/04

Orientador(a): Dr(a). Sueli dos Santos Freitas

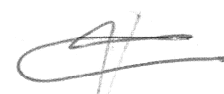
Aprovado pela Banca Examinadora:


Dr(a). Wagner Bettiol
EMBRAPA


Dr(a). Christina Dudienas
IAC


Dr(a). Sueli dos Santos Freitas
IAC

Data de Realização: 17/04/2006


Sueli dos Santos Freitas
Vice - Coordenadora
Pós - Graduação IAC

Aos meus pais, Valdenir e Selma,
tão presentes mesmo na distância,
por tudo que fizeram para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida.

À minha irmã, Mariana,
pelas palavras de apoio sempre tão bem humoradas

Ao meu namorado, Milton,
pelo carinho, compreensão e cumplicidade constantes

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Pós-Graduação do Instituto Agrônômico, pela oportunidade de realização deste trabalho.
- À Dra. Sueli dos Santos Freitas, pela orientação e ensinamentos;
- À Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício e ao Dr. Amaury S. dos Santos (Instituto Biológico), pelo apoio, incentivo e sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho e, também, pelo auxílio fundamental na condução do experimento;
- Ao Matheus A. Cipriano, pela valiosa colaboração na execução do trabalho;
- À Dra. Christina Dudienas (Instituto Agrônômico - Fitopatologia), pela atenção dispensada;
- À Dra. Maria Angélica Pizzinatto, por sua ajuda na elaboração do “abstract”;
- Ao Dr. Pedro R. Furlani, pelas sugestões e fornecimento de reagentes;
- À Cleusa P. Cabral (Laboratório de Nutrição de Plantas – CENA), pela solidária colaboração na obtenção de reagentes para análises;
- A todos os colegas da Microbiologia do Solo, em especial a Rosana, Valéria, Sara, Luís Guilherme e Sr. Lázaro (Lazinho), pela colaboração na execução do trabalho;
- Ao Sr. Wilson (ASSIAC), pelas diversas vezes em que ajudou no transporte dos materiais;
- Aos professores do curso de pós-graduação, em especial a Dra. Adriana Parada Dias da Silveira;
- Aos colegas do curso de Pós-Graduação e a todos que de algum modo participaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs)	2
2.2 O Controle Biológico por <i>Pseudomonas</i> spp.	3
2.3 Resistência Sistêmica Induzida (RSI) no Controle de Patógenos	6
2.4 Propriedades da Resistência Sistêmica Induzida por Rizobactérias	7
2.5 O Controle de Doenças em Cultivos Hidropônicos	10
2.6 O Patógeno <i>Pythium aphanidermatum</i> em Cultivos Hidropônicos	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Testes em Alface	13
3.1.1 Preparo da suspensão bacteriana e tratamento das sementes	13
3.1.2 Preparo do inóculo de <i>P. aphanidermatum</i>	14
3.1.3 Testes de confrontação entre o patógeno e os isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. em raízes de alface	15
3.2 Testes em Plantas de Pepino	15
3.2.1 Cultivo em sistema hidropônico	15
3.2.2 Preparo e aplicação da suspensão bacteriana	17
3.2.3 Preparo e aplicação do inóculo de <i>P. aphanidermatum</i>	18
3.2.4 Avaliações	19
3.3 Análise de Metabólitos Produzidos por <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescentes.....	20
3.3.1 Produção de ácido indol acético (AIA)	20
3.3.2 Produção de ácido hidrocianico (HCN)	20
3.3.3 Produção de β -1,3 glucanase	21
3.3.4 Produção de pectinase	21
3.3.5 Produção de celulase	22
3.4 Análise Estatística dos Resultados	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Testes em Alface	22
4.1.1 Promoção de crescimento e controle biológico	22
4.2 Produção de Metabólitos pelos Isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescentes .	29
4.2.1 Testes em alface quanto a promoção de crescimento.....	29
4.2.2 Testes em alface quanto ao antagonismo a <i>P. aphanidermatum</i>	33

SUMÁRIO

4.3 Testes em Plantas de Pepino	35
4.3.1 Primeiro experimento	25
4.3.2 Segundo experimento	42
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados bacterianos do grupo fluorescente de <i>Pseudomonas</i> spp. selecionados para o experimento <i>in vitro</i> e sua origem.	14
Tabela 2 - Exigência nutricional da cultura, fonte de nutrientes e as concentrações usadas na formulação da solução nutritiva para cultivo hidropônico de pepino.	17
Tabela 3 - Número de plântulas de alface vivas, 96 horas após receberem o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> em condições de laboratório.	28
Tabela 4 - Presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos produzidos pelos isolados bacterianos do grupo fluorescente de <i>Pseudomonas</i> spp.	30
Tabela 5 - Comprimento radicular (cm) e comprimento da lesão (cm) nas raízes das plantas de pepino que receberam o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> e de bactérias do grupo fluorescente de <i>Pseudomonas</i> spp. Experimento 1	38
Tabela 6 - Nota, segundo escala de 1 (nenhum escurecimento radicular) a 4 (raízes muito escurecidas) e porcentagem de escurecimento radicular das plantas de pepino que receberam o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> e de bactérias do grupo fluorescente de <i>Pseudomonas</i> spp. Experimento 1	41
Tabela 7 - Comprimento radicular (cm) e comprimento da lesão (cm) nas raízes das plantas de pepino que receberam o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> e de bactérias do grupo fluorescente de <i>Pseudomonas</i> spp. Experimento 2	45
Tabela 8 - Nota, segundo escala de 1 (nenhum escurecimento radicular) a 4 (raízes muito escurecidas) e porcentagem de escurecimento radicular das plantas de pepino que receberam o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> e de bactérias do grupo fluorescente de <i>Pseudomonas</i> spp. Experimento 2	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspecto geral do experimento realizado em casa de vegetação em sistema hidropônico.	16
Figura 2 -	Modelo seguido para a avaliação da severidade da doença nas raízes de pepino, segundo escala de notas.	19
Figura 3 -	Comprimento (cm) do hipocótilo e raiz de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> spp., cultivadas <i>in vitro</i> na presença e ausência do inóculo de <i>P. aphanidermatum</i>	23
Figura 4 -	Massa de matéria seca (g) das raízes de pepino cultivadas em sistema hidropônico pela técnica de raízes subdivididas, em que uma parte recebeu o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> e a outra parte não o recebeu, com o inóculo de diferentes rizobactérias. Experimento 1. ...	37
Figura 5 -	Largura do sistema radicular (cm) 40 dias após a emergência das plantas de pepino que receberam a aplicação de treze isolados de bactérias fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> spp., em sistema hidropônico, em presença e ausência de <i>P. aphanidermatum</i> . Experimento 1.	40
Figura 6 -	Massa da matéria seca (g) das raízes de pepino cultivadas em sistema hidropônico pela técnica de raízes subdivididas, em que uma parte recebeu o inóculo de <i>P. aphanidermatum</i> e a outra parte não o recebeu, com o inóculo de diferentes rizobactérias. Experimento 2. ...	43
Figura 7 -	Largura do sistema radicular (cm) 40 dias após a emergência das plantas de pepino que receberam a aplicação de treze isolados de bactérias fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> spp., em sistema hidropônico, em presença e ausência de <i>P. aphanidermatum</i> . Experimento 2.	47

BERNARDES, Fernanda de Sousa. **Rizobactérias na Indução de Resistência Sistêmica em Cultivos Hidropônicos**. 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Pós-Graduação - IAC.

RESUMO

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) são assim denominadas por sua capacidade em aumentar o desenvolvimento vegetal por diversos modos de ação. O cultivo hidropônico é uma importante técnica agrícola que permite incrementos na produtividade e qualidade dos produtos, mas são propícias ao desenvolvimento de doenças fúngicas e bacterianas. O controle de patógenos exercido por RPCPs é uma alternativa viável e econômica na prevenção de doenças nesses ambientes. A ativação de respostas de defesa na planta, processo conhecido como resistência sistêmica induzida (RSI) pode ser uma das formas de controle da doença pelas rizobactérias. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar se isolados pertencentes ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* inoculados em sementes de alface (*Lactuca sativa* cv. Verônica) apresentam caráter antagônico a *Pythium aphanidermatum in vitro*; observar se a aplicação prévia dos isolados selecionados *in vitro* reduz a severidade dos sintomas provocados por *P. aphanidermatum* em pepino (*Cucumis sativus* cv. Hokushin) cultivado em sistema hidropônico e detectar a produção de compostos antagônicos e ou promotores de crescimento pelas rizobactérias usadas no estudo. Foram realizados em delineamento inteiramente casualizado um experimento em laboratório (*in vitro*) com cinco repetições e dois em casa de vegetação (*in vivo*) com quatro repetições. O experimento *in vitro* consistiu na inoculação dos isolados em sementes pré-germinadas de alface, distribuídas sobre ágar-água, contendo no centro das placas de Petri o inóculo de *P. aphanidermatum*. No quinto dia após a inoculação, determinou-se o comprimento do hipocótilo, raiz e o número de plântulas vivas. No experimento *in vivo* utilizaram-se plântulas de pepino desenvolvidas em sistema hidropônico. Pela aplicação da técnica de raízes subdividas, parte do sistema radicular recebeu a suspensão bacteriana e a outra o inóculo de *P. aphanidermatum*. A ocorrência e a severidade dos sintomas da doença foram quantificadas pela determinação da matéria seca da parte aérea e raízes, comprimento radicular, largura do sistema radicular, comprimento da lesão provocada pelo patógeno nas raízes, padronização de uma escala de notas de acordo com o escurecimento radicular e porcentagem de escurecimento nas raízes. Dos 60 isolados testados no experimento *in vitro*, 37% promoveram maior crescimento radicular e 39%,

maior desenvolvimento do hipocótilo na ausência do patógeno, sendo que, desses, oito e dezenove, respectivamente, foram benéficos tanto na ausência como na presença do patógeno, para o crescimento da raiz e hipocótilo. Os isolados Ps 21A, Ps 140B e Ps 140C proporcionaram maior desenvolvimento radicular e do hipocótilo nos tratamentos sem e com *P. aphanidermatum*. No experimento *in vivo* o comprimento e a largura do sistema radicular não foram variáveis adequadas para se avaliar o efeito do patógeno sobre as plantas. Os isolados Ps 140B e Ps 140C não apresentaram diferenças quanto à massa da matéria seca quando expostas ou não ao inóculo de *P. aphanidermatum*, demonstrando uma possível expressão da RSI. Não houve qualquer correspondência entre os compostos produzidos pelas rizobactérias e a promoção de crescimento vegetal e bioproteção entre os experimentos.

Palavras-chave: *Pseudomonas* spp., *Pythium aphanidermatum*, controle biológico.

BERNARDES, Fernanda de Sousa. **Rhizobacteria in the Induction of Resistance Sistemic in hidroponic crops**. 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Pós-Graduação - IAC.

ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) have ability to increasing the vegetable development by several modes of action. The hidroponic cultivation is an important agricultural technique that allows increments in the productivity and quality of the products. However, those areas are favorable to the development of diseases. The pathogen control exerted by PGPRs is a viable and economic alternative in the disease prevention. The activation of defense responses in the plant, process known as induced resistance systemic (IRS), can be a way for disease control by rhizobacteria. The objectives of this study were evaluate if fluorescent pseudomonads strains inoculated in pre-germinated lettuce seeds (*Lactuca sativa* cv. Verônica) present antagonistic activity against *Pythium aphanidermatum* *in vitro*; observe if previous application of the strains selected *in vitro* reduces the severity of the symptoms by *P. aphanidermatum* in cucumber (*Cucumis sativus* cv. Hokushin) cultivated in hidroponic system and detect the production of antagonistic and or growth promoters compounds for the rhizobacteria used in the study. An experiment in laboratory (*in vitro*) and two at greenhouse (*in vivo*) were developed in completely randomized design. In *in vitro* experiment the rhizobacteria strains were inoculated in pre-germinated seeds of lettuce, distributed on agar-water, in the center of Petri dishes, with *P. aphanidermatum* inoculum. At fifth day after the inoculation, the length of the hypocotil and of the roots and the number of seedling alive was determined. In *in vivo* experiment seedling of cucumber were developed in hidroponic system. For the application of the technical split-root, part of the root system received the bacterial suspension and the other one *P. aphanidermatum* inoculum. The occurrence and severity of disease symptoms were evaluated by shoots and roots dry weight, root length, root system width, lesion length by the pathogen in the roots, standardization of rating discolored roots percentage. Of the 60 strains tested in *in vitro* experiment 37% promoted largest root growth and 39% largest hypocotil development in pathogen absence; of those, eight and nineteen were beneficial as in the absence as in pathogen presence, respectively to the growths of the root and hypocotil. Strains Ps 21A, Ps 140B and Ps 140C provided largest development of roots and of hypocotil in the treatments without and with *P. aphanidermatum*. In *in vivo* experiment

roots length and width were not suitable variable to evaluate the effect of the pathogen on the plants. Strains Ps 140B and Ps 140C did not result in differences between dry weight when exposed or not to *P. aphanidermatum* inoculum, demonstrating a possible expression of IRS. There was not any correspondence among the compounds produced by rhizobacteria, the plant growth promotion and bioprotection.

Key-words: *Pseudomonas* spp., *Pythium aphanidermatum*, biological control.

1 INTRODUÇÃO

Muitas doenças comuns em cultivos convencionais, tendem a tornar-se mais severas em ambientes protegidos. A técnica do cultivo hidropônico apresenta diversos fatores que contribuem para a ocorrência do patógeno e consequente desenvolvimento de epidemias. Além de o clima no ambiente protegido ser mais quente e úmido, o cultivo hidropônico possui baixa diversidade biológica, facilidade de disseminação de patógenos pela circulação da solução nutritiva, alta densidade de cultivo, uniformidade e otimização das condições nutricionais, a fim de se expressar o máximo potencial produtivo e qualidade do produto.

Dentre os mais importantes e destrutivos patógenos causadores da podridão radicular em cultivos hidropônicos de diferentes culturas, destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Pythium*. A temperatura da solução nutritiva influencia na ocorrência de determinadas espécies de *Pythium* spp. nesses sistemas. Sob condições de temperatura acima de 25°C a espécie *Pythium aphanidermatum* está entre a mais comum e destrutiva. Medidas de desinfecção após a entrada de *P. aphanidermatum* no sistema hidropônico, como aplicação de solução de cloro, filtração, aquecimento da água e radiação ultravioleta, são pouco utilizadas, necessitando de maiores estudos para adequação de sua eficiência e viabilidade econômica. A falta de medidas eficientes para controlar a disseminação do patógeno após sua instalação no sistema hidropônico, apontam o controle biológico como uma alternativa viável, atuando na prevenção do estabelecimento de doenças.

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, denominadas de "rizobactérias promotoras de crescimento em plantas" (RPCPs), têm sido empregadas no controle de fitopatógenos com comprovada eficiência. A utilização dessas rizobactérias no controle biológico mostra-se adequada em relação às demais formas de controle químico. Certas espécies de *Pseudomonas* spp. podem atuar diretamente sobre o patógeno, já que ambos ocupam o mesmo ambiente rizosférico, pela produção de uma ampla variedade de metabólitos com propriedades antagônicas. O controle biológico clássico, ou seja, o antagonismo direto exercido por algum mecanismo de antibiose, nem sempre explica a supressão do patógeno. Pesquisas têm mostrado que certas RPCPs podem ativar, de algum modo, respostas de defesa inerentes ao hospedeiro. Esse

processo, conhecido com resistência sistêmica induzida (RSI), possui como características amplitude de efetividade e sistematicidade.

Estudos envolvendo espécies de *Pseudomonas*, como exemplo *P. fluorescens*, verificaram redução na severidade dos sintomas provocados por diferentes patógenos em plantas de pepino em diferentes sistemas de cultivo sob ambientes protegidos.

Diante dos fatos expostos, os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar, em plântulas de alface, se isolados do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* apresentam efeito antagônico a *Pythium aphanidermatum* e/ou na promoção de crescimento.
- b) Determinar se a aplicação prévia de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em plantas de pepino reduz a severidade dos sintomas provocados por *P. aphanidermatum*;
- c) Detectar a produção de metabólitos potencialmente antagônicos ao patógeno, como ácido hidrociânico (HCN), β -1,3-glucanase, pectinase, celulase e o promotor de crescimento ácido-indol-acético (AIA).
- d) Verificar quais das seguintes variáveis poderiam ser utilizadas na avaliação da incidência de *P. aphanidermatum* em plantas de pepino: massa da matéria seca das raízes e parte aérea, comprimento e largura do sistema radicular, comprimento da lesão provocada pelo patógeno, escurecimento das raízes avaliado por notas e por porcentagem de escurecimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs)

A rizosfera, palavra de origem grega criada a partir dos termos "rhizo" e "sphaera", expressa o volume de solo influenciado pela raiz, até a distância de 1 a 5 mm. Inicialmente denominada por HILTNER (1904), a rizosfera favorece intensamente a atividade microbiana pela liberação de compostos orgânicos, ricos em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros, presentes nos exsudatos, secreções, mucilagens e mucigel. Devido à disponibilidade de substratos, *Pseudomonas* e *Bacillus* podem apresentar tempo de geração 15 e 2,5 vezes, respectivamente, maiores na rizosfera do que em solo não rizosférico (CARDOSO & FREITAS, 1992; MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Para que certos microrganismos possam se estabelecer em um ambiente competitivo como a rizosfera, além da destreza de multiplicação e diversidade

metabólica, a capacidade de produzir substâncias antagônicas pode favorecer certos grupos de rizobactérias durante o processo de colonização radicular (ROMEIRO & GARCIA, 2003).

Segundo MISHUSTIN & NAUMOVA (1962), citados por LUZ (1996), as pesquisas sobre rizobactérias não simbióticas, promotoras do crescimento de plantas, iniciaram-se na Rússia em 1885, mas somente a partir de 1950 houve a utilização de inoculantes não rizobianos na agricultura, aumentando a produção de 10% a 20% naquele país. Diferentes são as formas pelas quais as plantas respondem à interação com as rizobactérias, podendo resultar em ausência de resposta, efeito benéfico ou prejudicial (SCHIPPERS et al., 1987). Os isolados bacterianos que promovem algum favorecimento à planta, após a colonização radicular, são denominados rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (KLOEPPER & SCHROTH, 1978).

As RPCPs podem aumentar a taxa de germinação das sementes e o crescimento radicular, melhorando o desenvolvimento da parte aérea e, conseqüentemente, proporcionando maior rendimento das culturas. Essas promoções devem-se à habilidade de certas rizobactérias em solubilizar e aumentar a absorção de fósforo, fixar o nitrogênio, produzir sideróforos que seqüestram e disponibilizam íons férricos, oxidar o enxofre, produzir compostos análogos a hormônios vegetais, como ácido-indol-acético (AIA), giberelinas, citocininas e 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (CARDOSO & FREITAS, 1992; CATTELAN, 1999; ZAGO et al. 2000). Os benefícios alcançados pela utilização das RPCPs podem ser conseguidos de forma direta, quando na ausência de microrganismos patogênicos, ou de forma indireta, se tais benefícios são resultado do controle biológico (WELLER, 1988).

2.2 O Controle Biológico por *Pseudomonas* spp.

O controle biológico é resultado da redução ou limitação da densidade de inóculo de um patógeno ou parasita e das atividades que levam à doença, pela ação de um ou mais organismos com propriedades antagônicas, realizada naturalmente ou pela manipulação do ambiente (COOK, 1985). A aplicação do controle biológico na agricultura vem de tempos remotos. Segundo COOK & BAKER (1983), citados por ROMEIRO & GARCIA (2003), cinco mil anos antes de Cristo os egípcios já faziam uso dessa prática de modo intuitivo.

Os mecanismos de ação do controle biológico são: antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesas do hospedeiro (BETTIOL & GHINI, 1995). A identificação de espécies antagônicas a determinados patógenos e sua aplicação em estudos *in vitro* e *in situ* levam ao entendimento de alguns processos. Contudo, o controle biológico apresenta mecanismos complexos e nem sempre pode ser atribuído à ação de um simples fator. Ao contrário do controle químico, o biocontrole não erradica totalmente o patógeno de forma imediata. A otimização de seu uso está direcionada a métodos preventivos, aliados a outros fatores ligados ao manejo integrado de doenças.

Buscando adequar o uso do controle biológico na agricultura, estudos sobre o solo, seus habitantes, suas interações e formas de manejo começaram a ser investigados com rigor científico somente no século XIX. Nos últimos 20 anos, foram registrados cerca de 40 produtos comerciais de origem biológica nos EUA, pelo investimento em pesquisas nessa área (PAULITZ & BÉLANGER, 2001).

Pseudomonas spp. recebem especial atenção no meio científico, não só pela sua versatilidade metabólica, que lhes confere capacidade de se estabelecer nos mais variados ambientes, pelo grande potencial de colonização radicular e por serem promissoras na produção de reguladores de crescimento e antibióticos, mas também pela facilidade de cultivo *in vitro* e de manipulação genética (HASS & KELL, 2003). Entretanto, o desenvolvimento de produtos comerciais que utilizam *Pseudomonas* spp. é de difícil realização pelo comportamento instável dessas bactérias (FREITAS & AGUILAR-VILDOSO, 2004).

O gênero *Pseudomonas* possui como características taxonômicas a forma de bastonete reto, raramente curvo; geralmente, possui mais de um flagelo polar (lofotriquia) e metabolismo estritamente aeróbio (STANIER et al., 1966; FERREIRA & SALGADO, 1995). São bactérias Gram-negativas e, portanto, possuem alto teor de lipídios na parede celular (FERREIRA & SALGADO, 1995). O grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, caracteriza-se pela produção de pigmentos, denominados pioverdinas ou pseudobactinas, fluorescentes sob luz ultravioleta, que atuam como sideróforos (BUCHANAN & GIBBONS, 1974; MEYER & ABDALLAH, 1978). Espécies conhecidas como *P. aeruginosa*, patógeno de animais, *P. syringae* e *P. marginalis*, fitopatógenos, *P. fluorescens* e *P. putida* pertencem ao grupo fluorescente (FERREIRA & SALGADO, 1995).

Embora houvesse muitos relatos sobre a atuação de *Pseudomonas* spp. como agentes de biocontrole, não era possível confirmar se determinado isolado persistia na rizosfera, já que é um gênero facilmente encontrado em raízes de plantas não tratadas com microrganismos, tornando-se impossível a diferenciação entre isolados introduzidos e nativos (MARIANO & KLOEPPER, 2000). A partir do emprego de técnicas como o uso da resistência a antibióticos e a aplicação da engenharia genética com o desenvolvimento de linhagens mutantes, conseguiu-se demonstrar o estabelecimento de certas rizobactérias na rizosfera e, simultaneamente, sua capacidade no controle de patógenos (HASS & KELL, 2003).

KLOEPPER et al. (1980), observaram que sideróforos produzidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes, além de promoverem melhor nutrição, convertida em maior crescimento vegetal, privavam outros microrganismos nativos de ferro, dificultando seu estabelecimento na rizosfera e possível colonização de patógenos. Outros trabalhos vieram a reforçar essa hipótese. GEELS & SCHIPPERS (1983) observaram que isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas* provenientes da periderme de batata foram capazes de controlar diferentes espécies de patógenos pela produção de sideróforos. O isolado 3551 de *P. fluorescens* reduziu a incidência de "damping-off" causada por *Pythium ultimum* em algodoeiro, quando comparado à mesma espécie mutante, incapaz de produzir sideróforos (LOPPER, 1988).

A produção de compostos antibióticos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes também é uma propriedade capaz de suprimir patógenos. TOMASHOW & WELLER (1988) verificaram, *in situ*, que *Pseudomonas fluorescens*, isolado 2-79, obtido de raízes de trigo, controlou *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, pela produção do metabólito secundário fenazina-1-ácido-carboxílico (PCA). Posteriormente, essa evidência foi confirmada, pelo uso de espécies mutantes de *P. fluorescens* 2-79 e *P. aureofaciens* 30-84 incapazes de produzir PCA quando inoculadas em trigo e na presença do patógeno (TOMASHOW et al., 1990).

VOISARD et al. (1989) observaram a supressão do patógeno *Thielaviopsis basicola*, causador da podridão preta das raízes em fumo, por *P. fluorescens* CHAO devido à produção do composto volátil ácido hidrocianico (HCN). LUZ (1996) relata que o HCN também pode promover o crescimento das plantas diretamente, aumentando o desenvolvimento de pêlos radiculares. Certas espécies de *Pseudomonas* são produtoras de glucanases e quitinases, enzimas que degradam a parede celular de fungos, constituídas por glucana e quitina (FRIDLENDER et al., 1993). Antibióticos,

como pirrolnitrina, pirroluteorina, oomicina A, 2,4-diacetilfloroglucinol, são produzidos por diferentes isolados de *Pseudomonas* sp. (ZAGO et al., 2000). Essas bactérias são relacionadas, também, ao fenômeno de exclusão de nicho, colonizando sítios específicos nas raízes (KLOEPPER et al., 1980).

2.3 Resistência Sistêmica Induzida (RSI) no Controle de Patógenos

Há relatos de que a ação antagônica direta, simplesmente, não explica o controle da doença, pois não há formação de metabólitos inibidores e/ou o agente causal da doença e os microrganismos benéficos estão separados espacialmente (VAN LOON et al., 1998; MARIANO & KLOEPPER, 2000). Na década de 80, pesquisadores que estudavam o controle biológico utilizando rizobactérias suspeitaram de que certas linhagens ativavam de alguma forma o sistema de defesa das plantas hospedeiras (ZEHNDER et al., 2001).

WEI et al. (1991), testando 94 isolados de RPCPs em pepino para o controle de *Colletotrichum orbiculare*, agente causador da antracnose, observaram que seis isolados foram capazes de reduzir o diâmetro das lesões e seu número nas folhas. Plantas de feijoeiro que tiveram suas sementes tratadas com *Pseudomonas fluorescens* S97 apresentaram redução no número de lesões foliares após a aplicação de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* (ALSTRÖM, 1991). VAN PEER et al. (1991) observaram que *Pseudomonas fluorescens* WCS417 diminuiu o sintoma provocado pela murcha de fusarium do cravo, quando o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* foi aplicado no caule das plantas. Esses trabalhos comprovaram que RPCPs exercem proteção, manifestada pela redução dos sintomas da doença e, também, pela inibição do crescimento do patógeno no hospedeiro, quando ambos se encontram separados espacialmente, denominando esse fenômeno de resistência sistêmica induzida (RSI) (VAN LOON et al., 1998).

O estudo desse processo é facilitado quando se utiliza um patógeno foliar; porém, quando se trata de um patógeno do solo, a separação pode ser obtida pelo sistema de raízes subdivididas (“split-root”). Um trabalho que demonstrou de forma precisa a indução de resistência por RPCPs contra a murcha de *Fusarium* foi desenvolvido por LIU et al. (1995). Os autores relataram que o isolado 89B-27 de *P. putida*, com bioluminescência característica, foi aplicado em parte do sistema radicular e não houve constatação de sua presença na outra parte que recebeu o patógeno

Fusarium oxysporum. Sua capacidade de induzir mecanismos de defesa foi constatada pelo atraso no surgimento dos sintomas e diminuição do número de plantas mortas.

KLOPPER et al. (1992), citados por VAN LOON et al. (1998) verificaram que isolados indutores de resistência contra antracnose em pepino, também foram efetivos contra o vírus do CMV ("cucumber mosaic virus") em casa de vegetação. Outros trabalhos, dos mesmos autores, mostraram que os mesmos isolados resultaram em RSI contra *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, agente causal da mancha angular das folhas, importante doença em cucurbitáceas, e *Erwinia tracheiphila* em condições de campo, indicando que a defesa sistêmica incitada por RPCPs é efetiva contra múltiplos patógenos (VAN LOON et al., 1998).

2.4 Propriedades da Resistência Sistêmica Induzida por Rizobactérias

Quando uma RPCPs coloniza a raiz, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas agem como eliciadores, termo empregado pela primeira vez por KEEN (1975), para designar substâncias capazes de induzir reação de defesa nas plantas. Esses eliciadores atuam como sinais e percorrem sítios distantes do local de sua origem, acionando genes codificadores de compostos de defesa, havendo assim a expressão da RSI, segundo VAN LOON et al. (1998). Os principais sinais endógenos que levam a respostas de defesa nas plantas são o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico e etileno.

Fenotipicamente, RSI por RPCPs é similar à resistência clássica induzida por agentes patogênicos, conhecida por resistência sistêmica adquirida (RSA) (MORAES, 1998; PIETERSE et al., 2005). Conforme citado anteriormente, a RSI é efetiva contra um amplo espectro de patógenos, assim como a RSA. Contudo, existem diferenças claras (PIETERSE et al., 2001). O processo de resistência por RSI e RSA apresenta espectro de efetividades diferentes em relação aos patógenos. Além dos patógenos, a RSA pode ser ativada também por produtos químicos, como silicatos, fosfatos, benztiazole (BTH), entre outros (STICHER et al., 1997). Sua manifestação envolve acúmulo local e sistêmico de níveis endógenos de AS, ou seja, sua indução é salicilato-dependente (AS-dependente), apresentando, também, a expressão de inúmeros genes, incluindo os que levam à formação de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) (MÉTRAUX et al., 1990; STICHER, et al., 1997).

Buscando identificar componentes da rota metabólica da RSI, muitos trabalhos iniciaram estabelecendo paralelos com os resultados obtidos em RSA. A formação de proteínas-PR foi um dos primeiros aspectos estudados. HOFFLAND et al. (1995) verificaram que plantas de rabanete tratadas com o isolado WCS417r, indutor de RSI contra *Fusarium* sp., não acumularam proteínas-PR. Entretanto, MAURHOFER et al. (1994) observaram o acúmulo de proteínas na indução de resistência contra o vírus da necrose do fumo (TNV) ocasionada por *Pseudomonas fluorescens* CHA0. PARK & KLOEPPER (2000) relataram que a RSI promovida por alguns isolados de RPCPs contra *P. syringae* pv. *tabaci* ativou o gene PR-1a, levando à formação de proteínas-PR. GUZZO (2003), em sua ampla revisão, concluiu que o acúmulo de proteínas-PR no hospedeiro ocorre em resposta à infecção por um patógeno ou por algum agente abiótico, não estando correlacionada com a RSI por rizobactérias.

O isolado WCS417r foi responsável pela indução de RSI em plantas de *Arabidopsis* não acumuladoras de AS (PIETERSE et al., 1996). Outro estudo, sob o mesmo enfoque, envolveu RPCPs com a síntese de AS no processo de RSI em pepino. Os resultados indicaram que o AS presente na planta não induziu resistência nas raízes contra *Pythium aphanidermatum*, acreditando-se que o AS produzido pela planta foi rapidamente ligado à forma β -glucosil, que não possui ação indutora (CHEN et al., 1999). Os resultados acima confirmam que a RSI não está associada ao acúmulo de AS na planta, sendo regulada por uma outra rota de sinalização distinta.

PIETERSE et al. (1998) tentaram elucidar quais as rotas metabólicas que se referem à RSI. Trabalharam com diferentes ecótipos de *Arabidopsis* mutantes quanto à produção de ácido jasmônico e etileno e suas capacidades em expressar RSI quando receberam inóculo de *P. fluorescens* WCS417r e foram expostas ao patógeno. Os autores concluíram que ambos os reguladores de crescimento são necessários para que ocorra a RSI, pois nenhum dos mutantes conseguiu desenvolver RSI quando uma das rotas para síntese, seja do ácido jasmônico ou etileno estavam alteradas. Certos isolados de *Pseudomonas*, como CHAO, EP1 e Pfl, induziram resistência, pela síntese de jasminatos e etileno, contra a podridão vermelha da cana, causada por *Colletotrichum falcatum* (VISWANATHAN & SMIYAPPAN, 2001). A aplicação exógena desses compostos leva, freqüentemente, ao aumento da resistência a patógenos (PIETERSE et al., 2005).

Entre os eliciadores, os mais mencionados na literatura são os lipopolissacarídeos (LPS), constituintes da parede celular bacteriana; e os sintetizados

pelas próprias bactérias, sideróforos e ácido salicílico. A presença de um lipopolissacarídeo de cadeia O-antigênica, existente na membrana externa do isolado WCS417r de *Pseudomonas fluorescens*, foi relacionada ao processo de indução de resistência em tomate, pela colonização dos tecidos internos (DUIJFF et al., 1997).

Além desses compostos eliciadores, outros são relacionados à expressão da RSI. CHIN-A-WOENG et al. (2001) relacionaram a síntese e liberação de fenazina-1-carboxamina (PCN) na rizosfera por *Pseudomonas chlororaphis* à ocorrência de RSI contra *Fusarium oxysporum* em tomateiro. QUANT-HALLMANN et al. (1997) observaram que o isolado PsJN de uma espécie de *Pseudomonas* produtora de celulase poderia ativar a resistência sistêmica pela reação de hipersensibilidade devido à hidrólise da celulose na parede celular de plantas de algodão. A presença de 2,4-diacetilfloroglucinol, sintetizado por *Pseudomonas* sp., levou à ocorrência de RSI contra *Thielaviopsis basicola*, segundo PIERSON (1998), citado por ZAGO et al. (2000). ZDOR & ANDERSON (1992) verificaram a acumulação de compostos fenólicos e fitoalexinas em cotilédones de feijão tratado com um isolado de *Pseudomonas putida* produtor de HCN. ROMEIRO (2005) comenta a possível existência de macromoléculas de caráter protéico, glicoprotéico ou polissacarídeo como eliciadores de RSI. Para isso baseou-se nos relatos de SHARON & LIS (1972) e do próprio autor, de que para a ocorrência da interação molecular entre bactéria e planta é necessária a participação de macromoléculas, pois somente essas possuem a complexidade essencial para o reconhecimento entre os diferentes organismos, assim como nas interações antígeno-anticorpo.

Os mecanismos de resistência relacionados à RSI mediada por RPCPs podem ser estruturais ou bioquímicos (ROMEIRO & GARCIA, 2003), como o aumento da lignificação da parede celular, dificultando a entrada e a colonização do patógeno pela liberação de enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI & LEITE, 1994; HOFFLAND & BIK, 1993). CHEN et al. (2000) observaram que isolados de RPCPs foram capazes de induzir raízes de pepino a aumentar os níveis das enzimas ligadas aos mecanismos de defesa como peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO), que são envolvidas no processo de formação da lignina, e da enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), que participa da biossíntese de fitoalexinas. Segundo os autores, essas enzimas foram responsáveis pelo controle do patógeno *P. aphanidermatum*.

Certos trabalhos relatam que, em determinadas situações onde se aplicam RPCPs, existe o controle do fitopatógeno, juntamente com um maior ganho de biomassa

e melhor produção; outros já demonstraram que ocorre o controle do patógeno, com redução no desenvolvimento da planta (LUZ, 1996). A atuação da RSI pode variar com a idade da planta, o tratamento indutor, o intervalo de tempo entre o tratamento indutor e a inoculação do patógeno, os fatores ambientais, as condições de cultivo, o estado nutricional das plantas e os diferentes cultivares em relação ao indutor de resistência (PIETERSE et al., 2001; BONALDO et al., 2005).

2.5 O Controle de Doenças em Cultivos Hidropônicos

Ambientes protegidos possuem condições amplamente favoráveis ao desenvolvimento vegetal e, também, de patógenos. Alta umidade, temperatura em níveis constantes, intensidade de luz, disponibilidade de nutrientes, alta densidade e uniformidade de plantas, geralmente em estádios juvenis, são fatores que contribuem para o surgimento de doenças, aliando-se ao fato de os meios utilizados para o cultivo das plantas, substratos e água, apresentarem baixa diversidade microbiana, o que favorece ainda mais o estabelecimento e a multiplicação do patógeno (KIMATI & BERGAMIN FILHO, 1995; PAULITZ & BÉLANGER, 2001). Entretanto, essas mesmas condições benéficas a patógenos facilitam a introdução e a permanência de outros microrganismos para uso em controle biológico, como uma medida preventiva a doenças. A facilidade de uso, pelos modos de aplicação que podem ser via fertirrigação, pulverização ou tratamento de sementes, frente à área reduzida e à densidade de plantio, tornam sua utilização econômica (PAULITZ & BÉLANGER, 2001).

O sistema hidropônico, técnica de cultivo em ambientes protegidos, tem a solução nutritiva como meio de desenvolvimento das plantas ao invés do solo ou substratos orgânicos. Esse sistema apresenta como principais vantagens: melhor qualidade do produto, proteção contra intempéries e colheita fora de época. O sistema predominante adotado no Brasil para produções comerciais é a "Técnica do Filme Nutriente" (NFT) (FURLANI, 1999). No sistema NFT as plantas são adaptadas em um leito hidropônico, com fluxo laminar da solução nutritiva. Entretanto, o sistema hidropônico é um ambiente favorável ao desenvolvimento de doenças. Além dos fatores comuns aos ambientes protegidos já citados acima, o cultivo hidropônico permite rápida disseminação de patógenos via solução nutritiva (PAULITZ, 1997).

A falta de fungicidas e produtos fitossanitários registrados específicos para sistemas hidropônicos é outro fator que confere ao controle biológico o caráter de

alternativa à supressão de doenças. Devido ao pequeno mercado e baixo retorno econômico aos fabricantes, não há investimentos no desenvolvimento de produtos fitossanitários específicos. Existem técnicas de prevenção e controle de patógenos, como aplicação de radiação ultravioleta, filtração e ozonização (PAULITZ & BÉLANGER, 2001), porém sua instalação e utilização são caras, restringindo sua adoção, principalmente no Brasil, pela exigência de grande investimento, gastos com manutenção e pela falta de adequação das técnicas para o controle efetivo de patógenos. Um método viável de controle de doenças é a adição de fungicidas na solução nutritiva de sistemas hidropônicos recirculantes (STANGHELLINI & RASMUSSEN, 1994). Entretanto, em ambientes protegidos, fatores de intempéries, como ventos, chuvas e radiação, são excluídos ou amenizados, o que torna mais longo o tempo de vida útil dos fungicidas. Além disso, a otimização das condições de cultivo reduz consideravelmente o tempo para a colheita, podendo esse anteceder ao tempo de carência necessário para a degradação do princípio ativo do fungicida (PAULITZ & BÉLANGER, 2001). O uso de desinfetantes como hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e amônia quaternária são alternativas empregadas por produtores brasileiros (YAÑEZ, 2000). Contudo, dependendo das concentrações aplicadas, pode prejudicar o desenvolvimento das plantas e/ou ser ineficaz na eliminação do patógeno.

No Brasil utiliza-se sistemas hidropônicos para o cultivo de espécies como morango, tomate, rúcula, agrião, salsa, cebolinha, manjeriço, aipo, menta e, principalmente, alface (FURLANI, 1999). Embora o cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) em sistema hidropônico não seja tão expressivo quanto as culturas citadas anteriormente, sua produção em campo aberto é de difícil manejo. Entre os fatores que oneram sua produção como o controle de pragas e doenças, plantas de pepino apresentam não-adaptabilidade a temperaturas inferiores a 17°C que afetam seu desenvolvimento e inviabilizam a formação de flores femininas (SONNENBERG, 1985). Por esses fatores, a partir da década de 80, alguns produtores brasileiros passaram a cultivar a espécie em ambientes protegidos (CARDOSO & SILVA, 2003).

2.6 O Patógeno *Pythium aphanidermatum* em Cultivos Hidropônicos

O gênero *Pythium*, pela nova classificação e caracterização de suas fases reprodutivas, pertence ao Reino Chromista (WEST et al., 2003). Sua peculiaridade está na composição de sua parede celular, que não apresenta quitina, mas celulose,

principalmente glucanas (HENDRIX & CAMPBELL, 1973; KRUGNER & BACCHI, 1995). Habitante saprófita natural do solo, é conhecido como um parasita facultativo e cosmopolita. Seu processo de colonização ocorre por ferimentos ou de forma direta, situação em que enzimas pectinolíticas degradam a lamela média das células, promovendo seu rompimento. Inicialmente, na região atacada há o surgimento de manchas encharcadas, que se tornam escurecidas com o progresso da doença. Possui comportamento agressivo, pois às custas dos nutrientes obtidos pela decomposição dos tecidos, vai se reproduzindo em profusão, matando rapidamente a planta.

Certas espécies de *Pythium* spp. representam os principais patógenos causadores da podridão radicular em sistemas hidropônicos, devido à sua adaptação em ambientes aquático são facilmente disseminados pela água (PAULITZ, 1997). Seus zoósporos são estimulados por exsudatos radiculares, nadando em sua direção (JONES et al., 1991). STANGHELLINI & RASMUSSEN (1994) definem que as espécies mais encontradas em cultivos hidropônicos são *P. ultimum* e *P. aphanidermatum*. Segundo os autores, nesses ambientes sua infecção ocorre, principalmente, por zoósporos, onde atraídos pelos exsudatos radiculares, fixam sob a superfície radicular, seguindo as etapas de encistamento, germinação e formação do tubo de germinativo com rápido crescimento. A espécie mais presente em nossas condições de temperatura, entre 20° e 35°C, é *Pythium aphanidermatum*, que pode afetar diferentes culturas, como feijão, milho, cana, cucurbitáceas e espécies ornamentais. Não há variedades resistentes à doença (KIMATI & BERGAMIM FILHO, 1995).

O patossistema pepino-*Pythium* sp. é bastante estudado em cultivos protegidos por causar grandes perdas na produção em países como Canadá e Alemanha (PAULITZ et al., 1992; CHÉRIF & BELÁNGER, 1992; CHEN et al., 1998). O pepino apresenta grande suscetibilidade ao patógeno, sendo uma boa espécie indicadora de sua presença no ambiente. Culturas em fase inicial apresentam maior suscetibilidade ao patógeno, contudo as plantas podem ser atacadas em qualquer período de desenvolvimento, reduzindo sua biomassa e produção, podendo apresentar infecções subclínicas (PAULITZ & BELÁNGER, 2001; UTKHEDE et al., 2000). As formas de contaminação por *Pythium* em sistemas hidropônicos ocorrem principalmente pela utilização de substratos e mudas contendo o inóculo do patógeno (OWEN GOING et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no ano de 2005, no Laboratório de Microbiologia do Solo, pertencente ao Centro de Solos do Instituto Agronômico (IAC) e no Centro Experimental Central do IAC.

3.1 Testes em Alface

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) crespa, cv. Verônica, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada esterilizada, as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro sobre algodão, previamente umedecidos e esterilizados. As sementes permaneceram nas placas por 24 horas em temperatura ambiente para germinação.

3.1.1 Preparo da suspensão bacteriana e tratamento das sementes

Os sessenta isolados de *Pseudomonas* spp. grupo fluorescente (Tabela 1) utilizados neste trabalho fazem parte da coleção de RPCPs do Instituto Agronômico (IAC), em Campinas (SP), mantidos em meio B de King et al. (1954), sob óleo mineral. Os isolados foram transferidos para tubos de ensaio com meio B de King inclinado e mantidos a 28°C por 24 horas. Uma "alçada" de cada colônia bacteriana foi transferida para tubos contendo 5 mL de solução $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, que foram, em seguida, agitados em agitador mecânico. As sementes pré-germinadas foram adicionadas às suspensões bacterianas, onde permaneceram por 45 minutos.

Para conhecer o número de células na suspensão utilizada para a inoculação das bactérias, realizou-se a contagem do número de células formadoras de colônia (UFCs). Prepararam-se diluições a partir de 1 mL da suspensão original, usada para a inoculação das sementes, em tubos com 9 mL da solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ até a diluição 10^{-7} . Alíquotas de 0,1 mL das respectivas diluições foram distribuídas sobre meio B de King e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski. Após a incubação por 48 horas a 28°C, foi feita a contagem de colônias formadas sobre a placa. A absorbância das mesmas diluições foi lida em espectrofotômetro a 600 nm. Os dados obtidos na contagem foram correlacionados com os valores de absorbância assim obtidos.

Tabela 1. Isolados bacterianos do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. selecionados para o experimento *in vitro* e sua origem.

Isolados	Origem	Isolados	Origem
Ps 21A	Rizosfera de algodoeiro	Ps 60B	Rizosfera de citrus
Ps 21B	"	Ps 62A	"
Ps 21C	"	Ps 63A	"
Ps 22A	"	Ps 70	"
Ps 22B	"	Ps 73	"
Ps 23B	"	Ps 85	Rizosfera de couve
Ps 23C	"	Ps 89	"
Ps 31B	Rizosfera de milho	Ps 91	Rizosfera de pimentão
Ps 31C	"	Ps 92	"
Ps 31D	"	Ps 140B	Rizosfera de rúcula
Ps 32	"	Ps 140C	"
Ps 33	"	Ps 141A	"
Ps 34C	"	Ps 142A	"
Ps 41B	Rizosfera de soja	Ps 142B	"
Ps 42B	"	Ps 143A	"
Ps 43B	"	Ps 143B	"
Ps 44A	"	Ps 143C	"
Ps 45A	"	Ps 221	Solo solarizado
Ps 45C	"	Ps 222	"
Ps 46A	"	Ps 223	"
Ps 47A	"	Ps 851D	Rizosfera de alface
Ps 47B	"	Ps 852B	"
Ps 47C	"	Ps 852C	"
Ps 47D	"	Ps 857C	Rizosfera de alface
Ps 51A	Rizosfera de tomateiro	Ps 864C	"
Ps 51B	"	Ps 865A	"
Ps 53A	"	Ps 866A	"
Ps 54A	"	Ps 866B	"
Ps 54B	"	Ps 871B	Rizosfera de alface
Ps 54C	"	W4F58	<i>P. fluorescens</i>

3.1.2 Preparo do inóculo de *Pythium aphanidermatum*

O isolado de *Pythium aphanidermatum* foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico, em Campinas. Para seu uso como inóculo nos testes, foi transferido para placas de Petri com meio V8, mantidas em câmara de incubação a 28°C por 96 horas, das quais eram retirados discos com meio de cultura e

micélio e repicados para o centro das placas onde seria desenvolvido o teste de confrontação.

3.1.3 Testes de confrontação entre o patógeno e os isolados de *Pseudomonas* spp. em raízes de alface

Placas de Petri contendo ágar-água receberam em seu centro um disco de 10 mm do meio V8 com micélio do patógeno. As sementes de alface, que já haviam recebido o inóculo bacteriano, foram distribuídas (10 sementes/placa) em torno do inóculo de *P. aphani dermatum*, a cerca de 3 cm de distância do disco com o patógeno, permanecendo em temperatura ambiente por 96 horas. Ao término do período, realizou-se a contagem das plântulas vivas e mediu-se o comprimento do hipocótilo e raiz.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada parcela representada por uma placa. Para cada isolado, prepararam-se 10 placas, cinco delas com o patógeno e cinco sem ele.

3.2 Testes em Plantas de Pepino

O delineamento usado no experimento *in vivo* foi o inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento. Cada parcela foi constituída por uma planta com raízes subdivididas, formando dois conjuntos de raízes; um deles recebeu a aplicação do isolado bacteriano e o outro recebeu o inóculo do patógeno (Figura 1). Os controles foram representados por plantas com e sem patógeno, ambas sem aplicação de isolado bacteriano.

3.2.1 Cultivo em sistema hidropônico

Sementes de pepino japonês híbrido (cv. Hokushin), após assepsia em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e sucessivas lavagens com água esterilizada, foram colocadas para germinar em placas de Petri, mantidas em temperatura ambiente, contendo papel filtro sobre algodão, ambos previamente esterilizados e umedecidos. No quinto dia após a germinação, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 50 mL de solução nutritiva com metade de sua concentração normal (Tabela 2), onde permaneceram por um período de aproximadamente 72 horas. A formulação da

solução nutritiva procurou atender as exigências nutricionais da cultura, segundo FURLANI et al. (1999).

No oitavo dia após a germinação, as plântulas foram transferidas para o sistema hidropônico. Inicialmente, cada plântula permaneceu em apenas um vaso, com capacidade de 2 litros de solução nutritiva, até um maior desenvolvimento das raízes. A divisão do sistema radicular aconteceu por volta do vigésimo dia após a germinação (DAG).

Durante o processo de divisão, feita por meio de um estilete previamente flambado, procurou-se manter uniformes as quantidades de raízes, agora separadas em dois vasos. As plântulas permaneceram sustentadas por uma haste de madeira presa a um dos vasos por fita adesiva. Com 23 DAG, as plantas receberam a suspensão bacteriana. Realizaram-se dois experimentos. No primeiro, o desenvolvimento das plantas ocorreu a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. No segundo, a temperatura foi de $28^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.

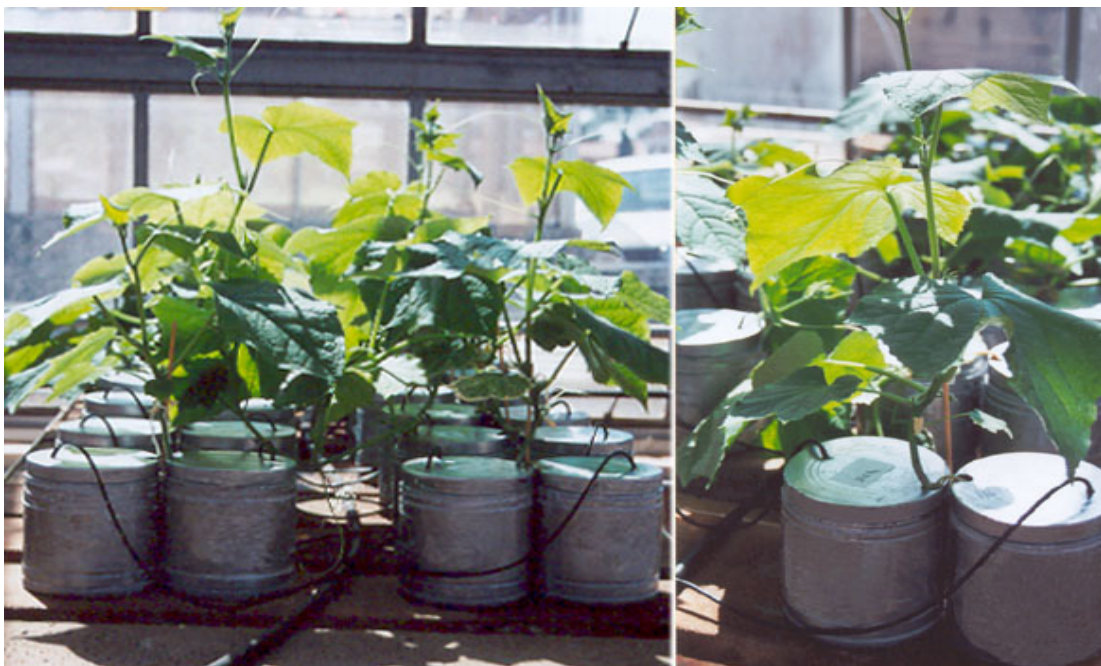


Figura 1. Aspecto geral do experimento realizado em casa de vegetação em sistema hidropônico.

Tabela 2. Exigência nutricional da cultura, fonte de nutrientes e as concentrações usadas na formulação da solução nutritiva para o cultivo hidropônico de pepino (FURLANI et al., 1999).

Elemento	Exigência (mg/L)	Fonte	Concentração (g/L)
K	254	KNO ₃	101,10
Ca	110	Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	236,15
N (NO ₃ ⁽¹⁾ ; NH ₄ ⁽²⁾)	168 ⁽¹⁾ ; 14 ⁽²⁾	NH ₄ NO ₃	80,04
P	31	KH ₂ PO ₄	136,09
S	32	K ₂ SO ₄	43,5
Mg	24	Mg(NO ₃) ₂	256,43
Cu	0,05	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,125
Zn	0,05	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
Mn	0,6	MnSO ₄ .H ₂ O	1,690
B	0,3	H ₃ BO ₃	1,771
Mo	0,05	H ₂ MoO ₄	0,088
Fe	0,8	FeEDDHA	13,33

3.2.2 Preparo e aplicação da suspensão bacteriana

No primeiro experimento, foram utilizados os isolados Ps 140B, Ps 140C, Ps 141A, Ps 142A, Ps 851D, Ps 852B, Ps 852C, Ps 857C, Ps 864C, Ps 865A, Ps 866A, Ps 866B e Ps 871B, escolhidos aleatoriamente. No segundo, procurou-se selecionar isolados que apresentaram algum efeito de redução dos sintomas, dentro dos parâmetros usados para avaliação da severidade da doença. Alguns dos isolados que não alcançaram qualquer efeito quanto à diminuição dos sintomas também foram escolhidos de modo a se confirmar os resultados obtidos anteriormente. Outros que mostraram capacidade no controle direto do patógeno e/ou agiram como promotores de crescimento no experimento *in vitro* também foram selecionados. Assim, no segundo experimento testaram-se os isolados: Ps 21B, Ps 32A, Ps 44A, Ps 45A, Ps 63A, Ps 89, Ps 140B, Ps 140C, Ps 141A, Ps 142A, Ps 142B, Ps 143C e Ps 852C. Ao término de ambos os experimentos foram 21 isolados bacterianos testados.

O processo de preparo e aplicação da suspensão foi o mesmo em ambos os experimentos. Os isolados foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 125 mL de meio B de King líquido, permanecendo na incubadora a 28°C por um período de 48 horas. Em seguida, os meios de cultura com o crescimento bacteriano foram centrifugados durante 15 minutos a 3000 x g. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 50 mL da solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para ressuspender as bactérias. Aplicaram-se 10 mL da suspensão nos vasos hidropônicos. A concentração de células bacterianas na suspensão foi estimada por contagem em placas de Petri, usando-se diluição em série com fator 10 e distribuindo uma alíquota de 100 μL com auxílio da alça de Drigalski sobre meio B de King. Usaram-se duas repetições para cada isolado. O número de células bacterianas usadas tanto nos experimentos *in vitro* como *in vivo* foi de aproximadamente $10^8/\text{mL}$ de suspensão.

3.2.3 Preparo e aplicação do inóculo de *Pythium aphanidermatum*

Placas com meio V8 receberam em seu centro discos de 10 mm contendo o micélio de *P. aphanidermatum*. Essas placas permaneceram em incubadora por 96 horas a 28°C. Ao término do período, discos de 10mm contendo o inóculo do patógeno foram transferidos para placas de Petri contendo água destilada esterilizada. Colocaram-se 25 discos por placa, onde ficaram imersos por mais 96 horas, mantidos em incubadora a 28°C para a formação de zoósporos. Completado o período de incubação, a água contida nas placas foi substituída por 25 mL de água destilada esterilizada, para estimular a liberação dos zoósporos. Aproximadamente uma hora depois, o conteúdo de cada placa foi removido para um almofariz, onde o micélio foi macerado, tornando-se uma massa homogênea, transferida para frascos previamente esterilizados. A suspensão obtida foi adicionada aos vasos hidropônicos quando as plantas estavam com 30 DAG. O número de zoósporos presentes na suspensão foi determinado pela adição de 1 mL de Tween 40 em uma alíquota de 4 mL^{-1} , a fim de reduzir a mobilidade dos zoósporos para a realização de sua contagem em um hemacitômetro. As concentrações de zoósporos obtidas no primeiro e segundo experimento foi em torno de 10^4 mL^{-1} .

3.2.4 Avaliações

Dez dias após a aplicação do patógeno, procedeu-se a coleta das plantas, sendo avaliadas as seguintes variáveis em cada conjunto de raízes:

1. comprimento das raízes;
2. largura do sistema radicular, medida 10 cm abaixo do colo, com as raízes espalhadas sobre uma cartolina;
3. extensão da lesão provocada pelo patógeno no sistema radicular;
4. estimativa da área radicular com sintoma de escurecimento, expressa em porcentagem;
5. aplicação de notas quanto à severidade da doença nas raízes (Figura 2): 1 - nenhum escurecimento; 2 - pouco escurecidas, com cor marrom claro; 3 - moderadamente escurecidas com coloração marrom; 4 - muito escurecidas, com cor marrom escuro;
6. massa da matéria seca (raízes e parte aérea).



Figura 2. Modelo seguido para a avaliação da severidade da doença nas raízes de pepino, segundo escala de notas: 1. Raízes sem sintoma (nota 1); 2. Raízes pouco escurecidas (nota 2); 3. Raízes moderadamente escurecidas (nota 3) e 4. Raízes muito escurecidas (nota 4).

3.3 Análise de Metabólitos Produzidos por *Pseudomonas* spp. Fluorescentes

Todas as análises referentes a este item foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo - IAC. Utilizaram-se duas repetições para todas as determinações dos metabólitos descritos abaixo.

3.3.1 Produção de ácido indol acético (AIA)

A metodologia empregada para determinação de ácido indol acético (AIA) baseou-se na descrita por BRIC et al. (1991). Os isolados bacterianos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio Luria Bertani (LB), composto pelos seguintes reagentes (g L^{-1}): triptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5; ágar-bacteriológico, 20. Adicionaram-se à solução 5 mM de L-triptofano, que é precursor do AIA. O pH da solução foi ajustado para 7,5 pela adição de algumas gotas de NaOH 1 N, antes de autoclavar. Em seguida, o meio contendo os isolados foi coberto com membrana de nitrocelulose e mantido em incubadora a 28° por 24 horas.

Ao término do período, a membrana de nitrocelulose foi transferida para outra placa de Petri contendo papel Whatman nº2 umedecido com 2,5 mL da solução de Salkowski (GORDON & WEBER, 1951) modificada por BRIC et al. (1991), que consistia em 2% de uma solução 0,5 M FeCl_3 em 35% de ácido perclórico. Os isolados produtores de AIA formaram halos avermelhados na membrana de nitrocelulose no período de 30 minutos a 2 horas.

3.3.2 Produção de ácido hidrocianico (HCN)

Para a detecção do ácido cianídrico (HCN) seguiu-se o método descrito por BAKKER & SCHIPPERS (1987). Utilizou-se meio B de King suplementado com glicina $4,4\text{g L}^{-1}$. Antes da transferência dos isolados para a placa, esta foi invertida para a colocação do papel filtro na tampa. Após umedecer o papel filtro com a solução de ácido pícrico a 5% e NaCO_3 a 2%, transferiram-se os isolados para as placas, selando-as com parafilme em seguida. As placas foram mantidas em incubadora a 28°C. A mudança da coloração do papel de amarelo para vermelho-laranja indicou a produção de HCN por alguns isolados.

3.3.3 Produção de β -1,3-glucanase

De acordo com o método descrito por RENWICK et al. (1991) com algumas modificações, verificou-se a produção de β -1,3-glucanase. Utilizou-se o meio de cultura sólido livre de nitrogênio (MLN) citado por CATTELAN et al. (1999) com algumas adaptações de reagentes conforme se segue (g L^{-1}): NH_4NO_3 , 0,78; K_2HPO_4 , 0,80; KH_2PO_4 , 0,20; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,20; CaCl_2 , 0,06; NaCl , 0,10; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00024; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,00004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,010; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003; Na_2FeEDTA , 0,0028; H_3BO_3 , 0,005; ágar, 15. Como única fonte de carbono, adicionaram-se 5 g L^{-1} de laminarina (β -1,3-glucano). O sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio foram autoclavados separadamente e depois adicionados ao meio, também já autoclavado. Após a transferência das bactérias para as placas, estas foram mantidas em incubadora a 28°C por 72 horas. Usou-se solução de vermelho-congo $0,6 \text{ g L}^{-1}$ para cobrir completamente a superfície do meio de cultura nas placas de Petri, que foram então mantidas em temperatura ambiente por 90 minutos aproximadamente. Depois de drenar o excesso de corante, observou-se a formação de halos amarelo-laranjados em torno das colônias, indicando a hidrólise do β -1,3-glucano pela produção bacteriana de β -1,3-glucanase.

3.3.4 Produção de pectinase

Determinou-se a produção de pectinase seguindo a metodologia de CATTELAN et al. (1999). A transferência dos isolados deu-se em meio M9 com a seguinte composição, em g L^{-1} : K_2HPO_4 , 10,5; KH_2PO_4 , 4,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0; citrato de sódio, 1,0; extrato de levedura, 1,2; pectina cítrica 4,8; ágar, 15. Adicionaram-se ao meio 10 mL de uma solução com 20% de sacarose. Após esterilizar o meio de cultura, aplicou-se 1 mL de uma solução contendo 20 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água. Após a transferência dos isolados para as placas de Petri, essas permaneceram em incubadora por 48 horas a 28°C . Terminado o período de incubação, o meio foi coberto por solução a 2 N de HCl. Consideraram-se produtoras de pectinase as colônias que formaram halos claros após a reação ácida.

3.3.5 Produção de celulase

Adotou-se o mesmo método descrito por CATTELAN et al. (1999), utilizando o meio M9, descrito acima, com exceção da pectina cítrica, substituída por celulose 10 g L⁻¹. Após a transferência dos isolados, as placas foram mantidas em incubadora a 28°C por 8 dias. A formação de halos claros em torno da colônia indica a produção de celulase.

3.4 Análise Estatística dos Resultados

Todos os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à análise de variância (GLM), tendo os valores de porcentagem transformados pela aplicação do $\arcsen \sqrt{x/100}$ para a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% (PIMENTEL-GOMES & GARCIA, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes em Alfaca

4.1.1 Promoção de crescimento e controle biológico

Dos 60 isolados testados 22 (37 %) promoveram maior crescimento radicular em relação ao controle, na ausência do patógeno *P. aphanidermatum* (Figura 3). Nos tratamentos com patógeno, 19 (32%) isolados, resultaram em maior crescimento radicular (Figura 3). Entretanto, somente os isolados Ps 21A, Ps 21C, Ps 43B, Ps 45C, Ps 89, Ps 140B, Ps 140C e Ps 857C foram benéficos na ausência e presença do patógeno. Segundo LUZ (1996) a promoção de crescimento por rizobactérias é um mecanismo de difícil identificação, geralmente, mais de um fator, vem a favorecer esse processo.

Nos tratamentos sem patógeno, observou-se que 23 isolados (39%) propiciaram maior desenvolvimento do hipocótilo (Figura 3). Já na presença de *P. aphanidermatum*, as plântulas tratadas com 26 (44%) isolados mostraram maior comprimento do hipocótilo. Analisando os tratamentos citados acima, 19 isolados promoveram o crescimento do hipocótilo tanto na presença quanto na ausência do patógeno.

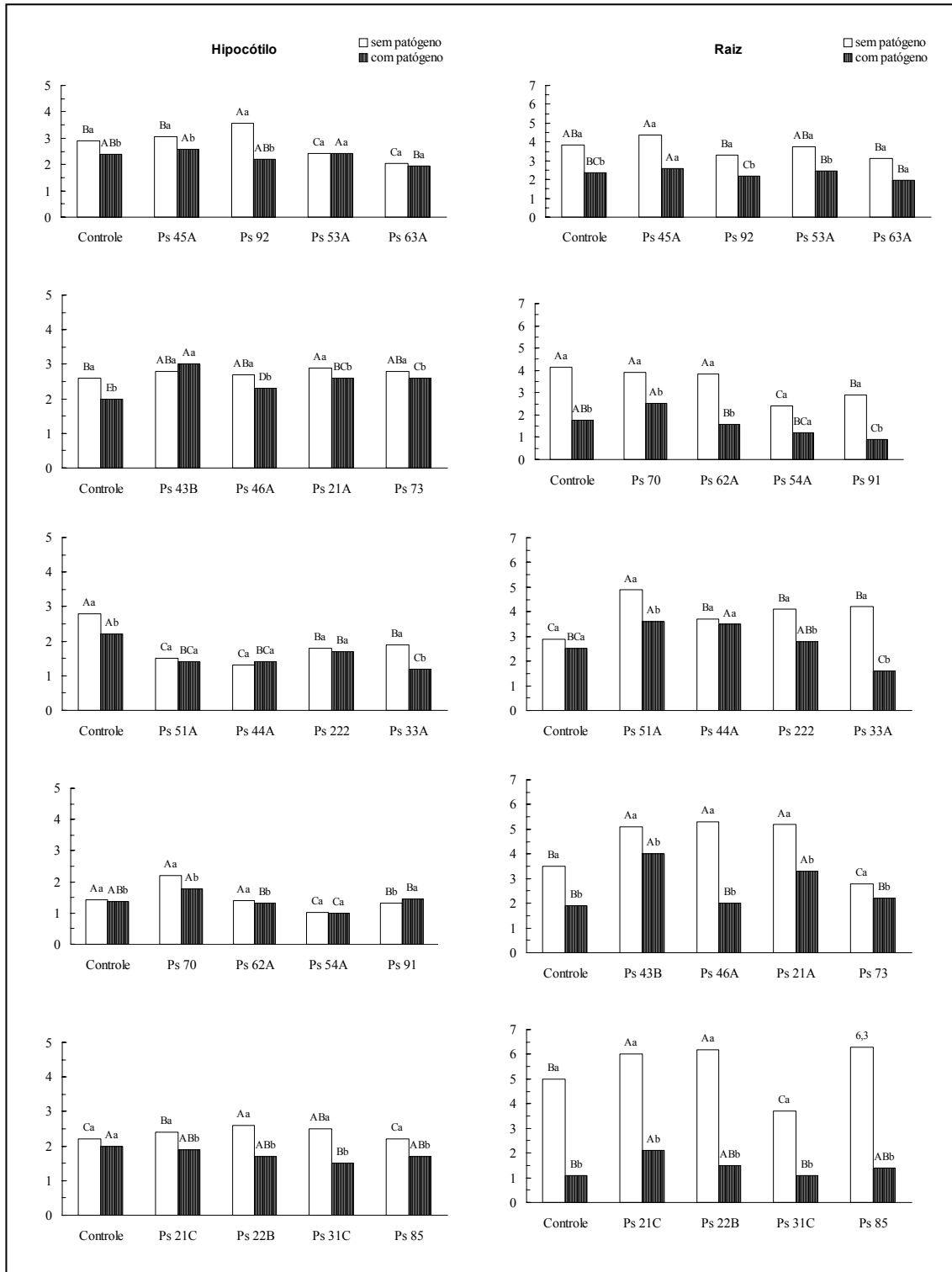


Figura 1. Comprimento (cm) do hipocótilo e raiz de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescentes de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e ausência do inóculo de *P. aphanidermatum*. Médias de 10 repetições (Continua). Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphanidermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

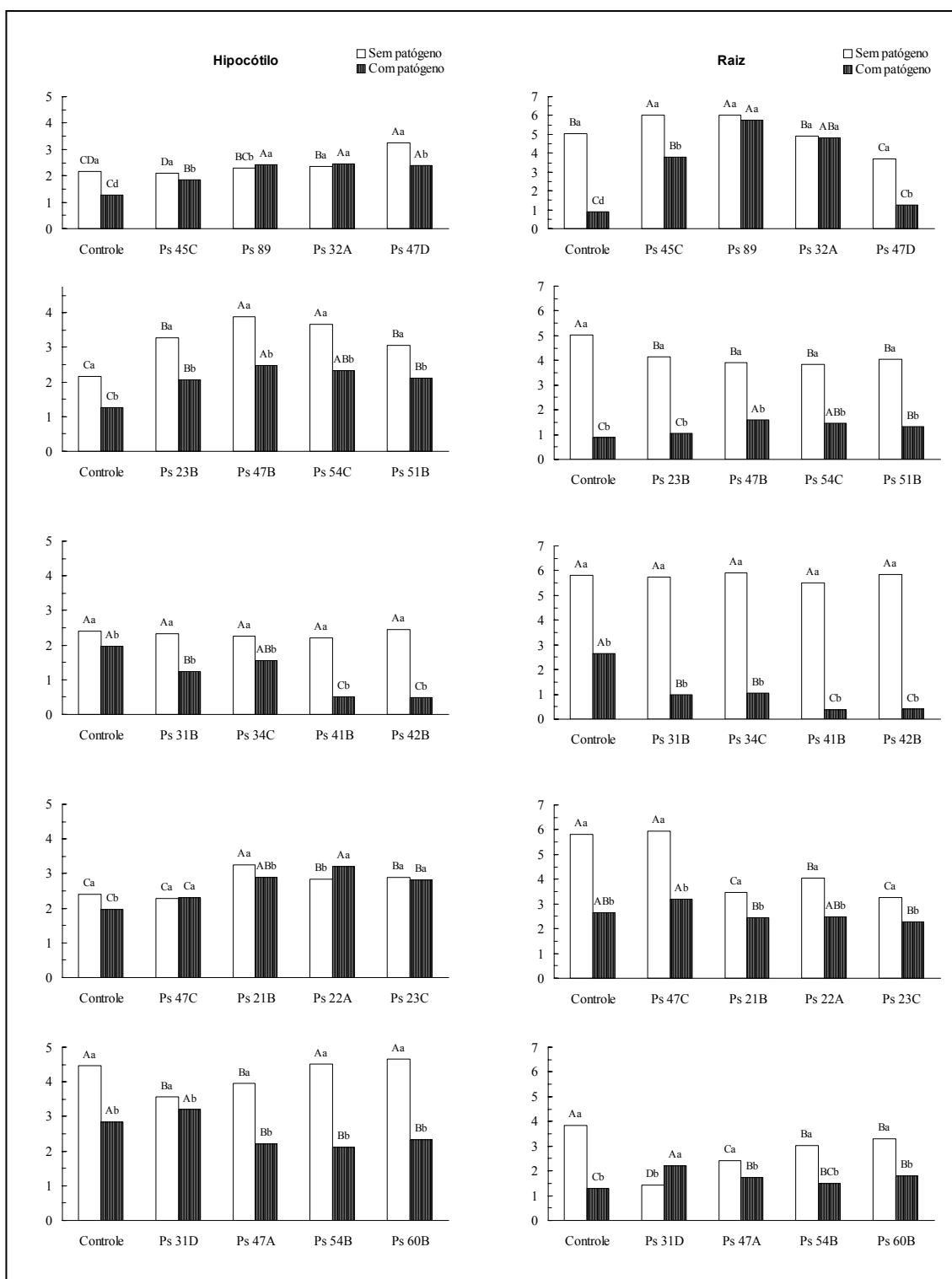


Figura 1. Comprimento (cm) do hipocótilo e raiz de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescentes de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e ausência do inóculo de *P. aphanidermatum*. Médias de 10 repetições (Continuação). Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphanidermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

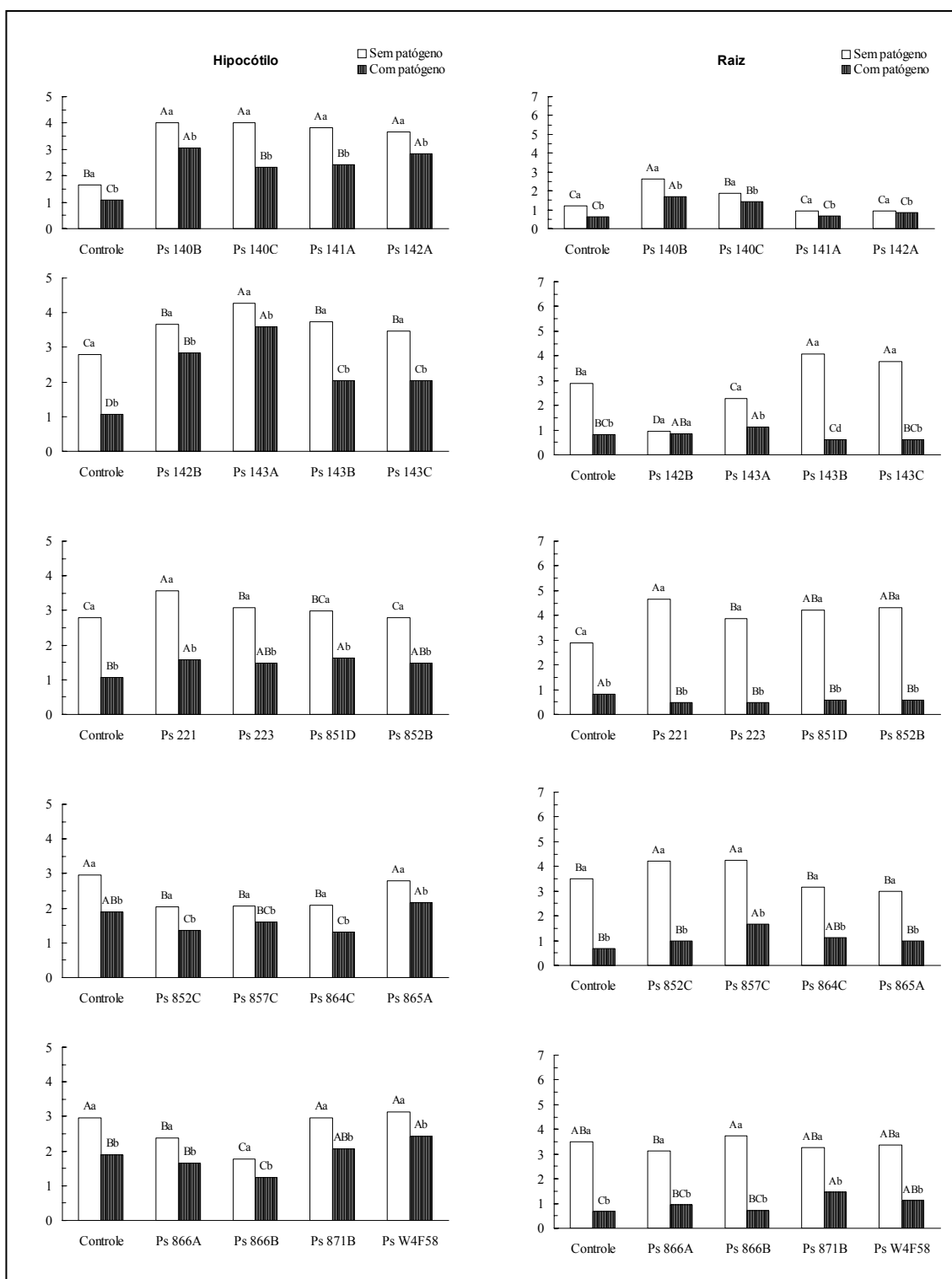


Figura 1. Comprimento (cm) do hipocótilo e raiz de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados do grupo fluorescentes de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e ausência do inóculo de *P. aphanidermatum*. Médias de 10 repetições (Continuação). Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphanidermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

Os isolados Ps 21A, Ps 21C, Ps 22B, Ps 140B, Ps 140C, Ps 143B, Ps 143C, Ps 221 e Ps 223 apresentaram efeito benéfico sobre a raiz e hipocótilo na ausência do patógeno. Mas apenas três desses isolados - Ps 21A, Ps 140B e Ps 140C - proporcionaram maior desenvolvimento radicular e do hipocótilo nos tratamentos sem e com *P. aphanidermatum*.

Não foi possível a determinação da massa de matéria seca das plântulas de alface, pois muitas dessas que foram submetidas ao tratamento com patógeno se deterioraram, impossibilitando a determinação de sua massa.

No presente estudo não realizou-se nenhuma análise para observar a ocorrência da colonização radicular pelos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nas raízes das plântulas de alface. SOTTERO (2003) avaliando a capacidade de colonização de isolados do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp., advindos de diferentes espécies vegetais, observou que a maioria dessas rizobactérias colonizavam apenas a região do colo das plântulas de alface (cv. Brasil 221) e nem todas promoveram crescimento. ZAGO et al. (2000) em sua revisão comenta que os microrganismos localizam-se, principalmente, nas regiões de maior ramificação e nas partes mais velhas da raiz, ou seja, regiões próximas ao colo. Alguns dos isolados estudados por SOTTERO (2003) foram selecionados para aplicação neste trabalho. Entretanto, não se observou qualquer correspondência entre a colonização radicular e/ou do colo das plântulas pelos isolados e os resultados aqui obtidos.

Considerando os tratamentos que promoveram maior crescimento radicular na presença do patógeno e aqueles em que não houve diferenças no comprimento radicular entre as plântulas que receberam o patógeno e as que não o receberam, atribui-se a 35% dos isolados o caráter de antagonistas a *P. aphanidermatum*. As plântulas tratadas com o isolado Ps 54A não diferiram estatisticamente quando na presença e ausência do patógeno. Possivelmente, esse efeito se deva ao reduzido crescimento de ambas as partes vegetativas, hipocótilo e raiz, nos tratamentos sem e com patógeno. Esse mesmo isolado no tratamento com patógeno apresentou elevada mortalidade das plântulas (Tabela 3).

O número de células bacterianas usadas tanto nos experimentos com alface realizados *in vitro* como nos experimentos com plantas de pepino, desenvolvidas em casa de vegetação, foi de 10^8 mL⁻¹ de suspensão, conforme já citado. BULL (1987), citado por WELLER (1988), usou doses crescentes (0, 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^8 ufc/semente) da espécie *Pseudomonas fluorescens* 2-79 em trigo contra *Gaeumannomyces graminis*

var. *tritici*. O autor verificou uma relação inversa entre a concentração de células bacterianas aplicadas e o número de lesões provocadas pelo patógeno, concluindo que o controle da doença está diretamente relacionado à colonização radicular.

Observaram-se visualmente diferentes sintomas entre os tratamentos expostos ao patógeno. Entre os sintomas havia: necrose apenas na ponta da raiz, com formação de raízes laterais, o que permitia um maior desenvolvimento do hipocótilo; necrose da ponta da raiz sem desenvolvimento de raízes laterais; necrose total da raiz principal e também das secundárias; necrose total das plântulas. Embora, essas características não tenham sido um parâmetro de avaliação entre os tratamentos, pode-se supor que os isolados bacterianos influenciaram a ocorrência desses sintomas. Estabelecendo um paralelo entre os tratamentos bacterianos que apresentaram reduzido crescimento radicular, porém, promoveram bom desenvolvimento do hipocótilo, diferindo-o do controle, pode-se supor que esses isolados tenham de alguma forma promovido essa resposta pela formação de raízes secundárias. Alguns análogos de hormônios de plantas como AIA é também produzido por rizobactérias que exibem propriedades para o controle biológico. Embora, o AIA não esteja diretamente ligado como um metabólito para o controle de patógenos, ele estimula o crescimento de raízes e o desenvolvimento de pêlos radiculares (DOWLING & O'GARA, 1994).

O contato entre isolado bacteriano e patógeno permitiria que o antagonismo se manifestasse, seja pela produção de antibióticos ou pela competição por espaço e nutrientes. As condições de teste incluem a planta, o que o diferencia de um teste de confrontação do patógeno e potencial agente de controle biológico, em placas com meio de cultura. Essa pode ser uma forma de facilitar os testes de seleção de agentes de controle biológico, desde que os resultados obtidos correspondam aos verificados em condições de casa de vegetação. Não se pode esquecer que se está trabalhando com três seres vivos: a planta, o patógeno e a bactéria, todos influenciados grandemente pelo ambiente em que interagem. Organismos pertencentes a um gênero ou a uma mesma espécie podem apresentar comportamentos distintos frente à interação com outros organismos e mudanças ambientais (WHIPPS, 2001). A temperatura é um dos fatores mais importantes para a ocorrência de infecções, interferindo na patogenicidade de *P. aphanidermatum* (HENDRIX JR. & CAMPBELL, 1973). Espécies como *P. fluorescens* e *P. putida* mostraram ótimo crescimento *in vitro* nas temperaturas entre 25 e 30 °C, mas sua colonização é geralmente maior em temperaturas abaixo de 20°C (LOPPER et al, 1984). WELLER (1988) relata em sua revisão que o insucesso de um determinado

agente microbiano no controle biológico de patógenos na rizosfera em muitos casos se deve à baixa competitividade da bactéria e a sua incapacidade de colonizar a superfície radicular.

Tabela 3. Número de plântulas de alface vivas, 96 horas após receberem o inóculo de *P. aphanidermatum* em condições de laboratório.

Trat. ⁽¹⁾	Número de plântulas	Trat.	Número de plântulas	Trat.	Número de plântulas
Controle	49A*	Controle	26B	Controle	35A
Ps 45A	46A	Ps 45C	42A	Ps 140B	45A
Ps 92	44A	Ps 89	50A	Ps 140C	44A
Ps 53A	50A	Ps 32A	48A	Ps 141A	33A
Ps 63A	49A	Ps 47D	28B	Ps 142A	36A
Controle	44A	Controle	26B	Controle	27A
Ps 43B	48A	Ps 23B	43A	Ps 142B	27A
Ps 46A	43A	Ps 47B	49A	Ps 143A	41A
Ps 21A	46A	Ps 54C	39AB	Ps 143B	25A
Ps 73	50A	Ps 51B	45A	Ps 143C	25A
Controle	47A	Controle	41A	Controle	27A
Ps 51A	50A	Ps 31B	16B	Ps 221	31A
Ps 44A	50A	Ps 34C	16B	Ps 223	30A
Ps 222	35B	Ps 41B	2C	Ps 851D	18A
Ps 33A	43A	Ps 42B	3C	Ps 852B	28A
Controle	26A	Controle	41B	Controle	23A
Ps 70	36A	Ps 47C	46AB	Ps 852C	39A
Ps 62A	18AB	Ps 21B	50A	Ps 857C	41A
Ps 54A	1C	Ps 22A	50A	Ps 864C	25A
Ps 91	13B	Ps 23C	47AB	Ps 865A	45A
Controle	33A	Controle	44AB	Controle	24A
Ps 21C	28A	Ps 31D	50A	Ps 866A	35A
Ps 22B	39A	Ps 47A	37B	Ps 866B	36A
Ps 31C	30A	Ps 54B	40AB	Ps 871B	29A
Ps 85	35A	Ps 60B	50A	Ps W4F58	29A

*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si para cada conjunto de isolados e seu controle, ao nível de 5 %, pelo teste de Tukey.

Não houve diferença, quanto ao número de plântulas, entre os tratamentos sem patógeno, pois não ocorreu nenhuma mortalidade. O número de plântulas vivas no tratamento com patógeno diferiu em alguns tratamentos (Tabela 3). A associação de alguns tratamentos às possíveis causas das altas mortalidades será citada posteriormente.

4.2 Produção de Metabólitos pelos Isolados de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes

4.2.1. Testes em alface quanto a promoção de crescimento

Poucos foram os tratamentos que mostraram correspondência entre os resultados obtidos no experimento *in vitro* quanto à promoção de crescimento em plântulas de alface e ao controle biológico que pudessem ser associados à produção de determinado metabólito. A tabela 4 mostra quais dos metabólitos estudados são produzidos pelas rizobactérias selecionadas. O metabólito mais comumente produzido foi o AIA, observado para 24 isolados (40% do total de 60). A β -1,3 glucanase foi produzida por 16 isolados (27%), o HCN por 9 isolados (15%), a pectinase por 1 isolado (2%) e a celulase não foi produzida por nenhuma das bactérias. Doze isolados (20%) produziram dois compostos analisados. Nenhum deles produziu mais que dois metabólitos.

O maior crescimento radicular das plântulas tratadas com os isolados Ps 22B, Ps 143B, Ps 223, Ps 851D, Ps 852B, Ps 852C e Ps 857C, na ausência do patógeno, pode ser associado ao fato de essas bactérias serem produtoras de ácido indol acético (AIA) (Tabela 4). No entanto, outros isolados produtores de AIA não foram promotores do crescimento das plântulas de alface. Muitos tratamentos não apresentaram associação entre o desenvolvimento radicular e o crescimento da parte aérea. Três dos sete tratamentos citados acima, produtores de AIA, proporcionaram maior comprimento do hipocótilo. Outros quinze isolados, produtores ou não de diferentes metabólitos, foram capazes de promover crescimento radicular na ausência do patógeno em relação ao controle, sendo que esse efeito também se refletiu no desenvolvimento do hipocótilo das plântulas tratadas com Ps 21A, Ps 21C, Ps 22B, Ps 140B, Ps 140C, Ps 143B, Ps 143C e Ps 221 e Ps 223 (Figura 3).

Tabela 4. Presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos produzidos pelos isolados bacterianos do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. (Continua).

Isolados	HCN ⁽¹⁾	AIA ⁽²⁾	β -1,3 glucanase	Celulase	Pectinase
Ps - 21A	+	-	-	-	-
Ps - 21B	+	+	-	-	-
Ps - 21C	-	-	-	-	-
Ps - 22A	+	+	-	-	-
Ps - 22B	-	+	-	-	-
Ps - 23B	-	-	-	-	-
Ps - 23C	-	+	+	-	-
Ps - 31B	-	-	-	-	-
Ps - 31C	-	-	-	-	-
Ps - 31D	-	-	-	-	-
Ps - 32A	-	-	-	-	-
Ps - 33A	-	+	-	-	-
Ps - 34C	-	+	-	-	-
Ps - 41B	+	-	-	-	-
Ps - 42B	+	-	-	-	-
Ps - 43B	-	-	-	-	-
Ps - 44A	-	-	+	-	-
Ps - 45A	-	-	+	-	-
Ps - 45C	-	-	-	-	-
Ps - 46A	-	-	-	-	-
Ps - 47A	+	+	-	-	-
Ps - 47B	+	+	-	-	-
Ps - 47C	-	-	-	-	-
Ps - 47D	-	-	-	-	-
Ps - 51A	-	-	+	-	-
Ps - 51B	-	-	+	-	-

⁽¹⁾HCN - ácido hidrociânico

⁽²⁾AIA - ácido indol acético

Tabela 4. Presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos produzidos pelos isolados bacterianos do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. (Continuação).

Isolados	HCN ⁽¹⁾	AIA ⁽²⁾	β -1,3 glucanase	Celulase	Pectinase
Ps 53A	+	+	-	-	-
Ps 54A	+	-	-	-	-
Ps 54B	-	-	-	-	-
Ps 54C	-	+	+	-	-
Ps 60B	-	-	-	-	-
Ps 62A	-	+	-	-	-
Ps 63A	-	+	-	-	+
Ps 70	-	+	+	-	-
Ps 73	-	+	+	-	-
Ps 85	-	+	+	-	-
Ps 89	-	+	+	-	-
Ps 91	-	-	-	-	-
Ps 92	-	-	-	-	-
Ps 140B	-	-	-	-	-
Ps 140C	-	-	-	-	-
Ps 141A	-	-	-	-	-
Ps 142A	-	-	-	-	-
Ps 142B	-	-	-	-	-
Ps 143A	-	+	-	-	-
Ps 143B	-	+	-	-	-
Ps 143C	-	-	-	-	-
Ps 221	-	-	+	-	-
Ps 222	-	-	+	-	-
Ps 223	-	+	-	-	-
Ps 851D	-	+	-	-	-
Ps 852B	-	+	-	-	-

⁽¹⁾HCN - ácido hidrociânico

⁽²⁾AIA - ácido indol acético

Tabela 4. Presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos produzidos pelos isolados bacterianos do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. (Continuação).

Isolados	HCN ⁽¹⁾	AIA ⁽²⁾	β -1,3 glucanase	Celulase	Pectinase
Ps 852C	-	+	-	-	-
Ps 857C	-	+	-	-	-
Ps 864C	-	-	+	-	-
Ps 865A	-	+	-	-	-
Ps 866A	-	-	+	-	-
Ps 866B	-	-	+	-	-
Ps 871B	-	-	+	-	-
Ps W4F58	-	-	-	-	-

⁽¹⁾HCN - ácido hidrociânico

⁽²⁾AIA - ácido indol acético

Os isolados Ps 21B, Ps 22A, Ps 47A, Ps 47B e Ps 53A produtores de AIA e também de ácido hidrociânico (HCN) não apresentaram nenhum efeito benéfico sobre o crescimento radicular nos tratamentos que não receberam o inóculo de *P. aphanidermatum*. Entretanto, o isolado Ps 21A, produtor de HCN, foi benéfico ao crescimento radicular tanto na ausência quanto na presença do patógeno. BAGNASCO et al. (1998) concluíram que o principal mecanismo de controle de diferentes fungos patogênicos em leguminosas foi a produção de HCN, pois isolados de *P. fluorescens* produtores de sideróforos e de HCN não tiveram sua atividade antagônica afetada quando na presença de ferro.

O efeito das rizobactérias sobre patógenos também poderia explicar o benefício no crescimento radicular resultante dos tratamentos com os isolados Ps 45A, Ps 54C e Ps 89 que produzem a enzima β -1,3 glucanase. FRIDLENDER et al. (1993) verificaram que o metabólito β -1,3 glucanase, produzido por *Pseudomonas cepacia*, foi o responsável pela redução na incidência de doenças causadas por *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium roffsii* e *Pythium ultimum*.

Nenhuma das rizobactérias selecionadas foi identificada como produtora de celulase. Somente o isolado Ps 63A é produtor de pectinase. HALLMANN et al. (1997) observaram que bactérias endofíticas, geralmente, são produtoras de celulase e

pectinase. Após a colonização radicular, as bactérias induzem a produção dessas enzimas que degradam a parede celular, facilitando a penetração na planta hospedeira. STURZ & NOWAK (2000) relatam que microrganismos endofíticos, assim denominados por colonizarem o interior de tecidos vegetais, são mais estáveis, porque não estão expostos às condições rizosféricas, o que lhes conferiria vantagem na promoção de crescimento.

Em laboratório, para uma produção adequada de metabólitos por rizobactérias, é necessário que o meio de cultura possua uma fonte de carbono adequada, além de outros nutrientes. No campo, estes nutrientes são provenientes de exsudados de raízes e sementes. Contudo, existem vários fatores que podem influir na produção de um determinado metabólito, exemplo: a presença de zinco estimula a produção de fenazinas (SLINIGER & JACKSON, 1992), ferro estimula a produção de HCN e inibe a de sideróforos (VOISARD et al, 1989), temperaturas amenas favorecem a produção de 2,4 diacetilfloroglucinol (SHANAHAN et al, 1992), determinadas fontes de carbono possuem alta influência sobre o tipo e a quantidade de metabólito produzido (GUTTERSON et al, 1992).

4.2.2 Testes em alface quanto ao antagonismo a *P. aphanidermatum*

Conforme comentado anteriormente, entre os tratamentos expostos ao patógeno, 35% dos isolados promoveram maior crescimento radicular. Cerca de 53% dos isolados que apresentaram esse efeito são produtores de alguns dos metabólitos estudados, na sua maioria AIA e β -1,3 glucanase (Tabela 4). Considerando que os principais componentes da parede celular de *P. aphanidermatum* são glucanas, é provável, embora não tenha se realizado nenhum teste específico, que a promoção de crescimento tenha ocorrido pelo controle do patógeno.

Apesar de HCN ser um ácido volátil importante na inibição de agentes patogênicos, somente o isolado Ps 21A, produtor de HCN, Ps 47A e Ps 47B, ambos produtores de HCN e AIA, foram capazes de aumentar o crescimento radicular nos tratamentos com *P. aphanidermatum*. Os maiores índices de mortalidade de plântulas quando em presença do patógeno foram encontrados entre os isolados Ps 41B, Ps 42B e Ps 54A, produtores de HCN (Tabela 4). Contudo, na ausência do patógeno, não houve redução do crescimento das plântulas, com exceção do isolado Ps 54A, e perda de plântulas. Uma hipótese para essa diminuição no crescimento da raiz e hipocótilo das

plântulas pode estar ligada ao fato de que o isolado Ps 54A seja uma bactéria deletéria. Supõe-se que na presença do patógeno a produção do HCN tenha se intensificado a ponto de comprometer o desenvolvimento vegetal. KREMER & SOUISSI (2001) observaram que determinadas concentrações de HCN produzidas por rizobactérias influenciaram negativamente o crescimento de plântulas de alface, fato que poderia ter se repetido neste experimento.

Alguns isolados como Ps 21C, Ps 43B, Ps 45C, Ps 140B e Ps 140C não produziram nenhum dos metabólitos avaliados, porém apresentaram efeito benéfico tanto nos tratamentos sem e com patógeno. É possível que esses isolados sejam produtores de outros compostos como fenazinas, 2,4 diacetilfloroglucinol, ou algum tipo de sideróforo, que iniba o crescimento do patógeno.

Os isolados Ps 32A, Ps 45A, Ps 63A, Ps 89 e Ps 142B não mostraram diferença estatística entre o comprimento radicular dos tratamentos sem e com patógeno. Quanto ao comprimento do hipocótilo nove isolados, também, não diferiram quando expostos ou não ao patógeno. Considerando os tratamentos que se mostraram iguais na presença e na ausência de *P. aphanidermatum*, tanto na raiz quanto no hipocótilo, somente os isolados Ps 32A e Ps 63A apresentaram essa característica. Esse comportamento pode ser uma forma de comprovar a capacidade antagônica desses isolados sobre o patógeno, já que não houve diferença entre os tratamentos. Como se está avaliando o experimento *in vitro*, em que houve contato entre bactérias e patógeno, é mais provável que a inibição da manifestação do sintoma da doença ocorra por antagonismo.

Observa-se que o crescimento radicular e do hipocótilo dos controles de determinados grupos avaliados, não apresentaram diferenças entre os tratamentos na presença e ausência do patógeno, como se a doença não houvesse ocorrido. Supõe-se que o patógeno não tenha entrado em contato com a raiz, ou o tenha tardiamente, a ponto de não comprometer o crescimento radicular ou do hipocótilo da plântula até a avaliação.

A utilização de meio de cultura contendo ágar para a seleção de potenciais agentes de controle biológico é um processo bastante comum. Entretanto, há relatos sobre a redução do efeito inibitório de certos antibióticos (HANUS et al, 1967) e outros metabólitos produzidos por microrganismos (GREEMBERG, 1969) por moléculas iônicas presentes no ágar. Essas são consideradas responsáveis pela inativação química de certos compostos. Contudo, há quem defenda o emprego destes testes *in vitro*, já que

muitos isolados foram efetivos tanto em experimentos realizados *in vitro* como *in vivo*, confirmando sua capacidade de controle biológico por antibiose (CATTELAN, 1994).

Embora, muitos resultados não possam ser associados à presença de compostos produzidos pelas rizobactérias, as análises bioquímicas permitem selecionar isolados que apresentem maior probabilidade de serem eficientes em um processo de colonização e controle biológico (BAKKER et al., 1987; FRAVEL, 1988).

4.3 Teste em Plantas de Pepino

4.3.1 Primeiro experimento

Não houve diferença entre os tratamentos quanto à massa de matéria seca da parte aérea (dados não mostrados). A massa de matéria seca das raízes, também, não diferiu dos controles (Figura 4). Observando os valores encontrados no primeiro experimento, nota-se, de maneira geral, uma grande diferença na massa de matéria seca radicular em relação ao segundo experimento. É possível que essa diferença se deva a estresses sofridos pelas plântulas quando foram transferidas para o sistema hidropônico. A alta temperatura na casa-de-vegetação e problemas no sistema de aeração, durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas, provocaram um retardamento no seu crescimento. Tão logo os problemas foram corrigidos, o desenvolvimento das plantas melhorou, o que permitiu a continuidade do experimento. Entretanto, o estresse sofrido pelas plântulas acabou comprometendo consideravelmente seu ganho de massa.

Os tratamentos com os isolados Ps 140B, Ps 141A, Ps 852C, Ps 857C e Ps 866A não resultaram em diferenças na massa de matéria seca radicular das plantas que receberam o patógeno e as que não o receberam. Esse tipo de resposta obtida pela comparação dos efeitos da ausência e da presença do patógeno nas raízes de uma mesma planta ("raízes subdivididas") tratada também com rizobactérias pode indicar uma forma de controle indireto do patógeno pelos isolados bacterianos. Na literatura, há relatos sobre raízes de plantas tratadas com rizobactérias em que houve redução nos sintomas da doença pelo atraso e/ou diminuição na colonização do agente patogênico pela ativação de mecanismos de defesa na planta de ordem física e/ou bioquímica (BENHAMOU et al., 1996; CHEN et al., 2000), fenômeno já comentado como resistência sistêmica induzida, ou RSI.

O tempo de aplicação da rizobactéria, sua concentração e o intervalo estabelecido para a inoculação do patógeno pode intervir na ocorrência das respostas de defesa, dentro de um período satisfatório para o controle da doença (PAULITZ et al, 1992). ZHOU & PAULITZ (1994) verificaram a ocorrência de RSI por *Pseudomonas* spp. inoculadas em pepino uma semana antes da aplicação do inóculo de *P. aphanidermatum*, usando a mesma metodologia de divisão do sistema radicular. Neste trabalho, semelhantemente, as bactérias foram inoculadas nas raízes uma semana antes do inóculo do patógeno.

Os sistemas radiculares das plantas que receberam os demais isolados bacterianos diferiram quando se comparou a parte das raízes que recebeu o patógeno e a que não o recebeu. Isso indica que as rizobactérias não induziram qualquer resistência da planta à infecção pelo patógeno. Nesse experimento, realizado em casa de vegetação, não houve o efeito de promoção do crescimento pelas rizobactérias. No experimento *in vitro* os isolados Ps 140B, Ps 140C, Ps 851D, Ps 852B, Ps 852C e Ps 857C promoveram crescimento em plântulas de alface. No experimento com plantas de pepino, esses isolados não repetiram essa ação, considerando-se, é claro, que se trata de espécies vegetais diferentes. Todavia, os isolados Ps 140B, Ps 852C e Ps 857C tiveram efeito benéfico sobre as plantas de pepino, ainda que, neste experimento, esse efeito tenha sido o de minimizar os danos do patógenos à massa de matéria seca das raízes.

Os isolados Ps 851D, Ps 852B, Ps 852C e Ps 857C são produtores de AIA (Tabela 4), que poderia ter aumentado a quantidade de raízes sob seu efeito; porém no experimento *in vivo* isso não foi observado. É possível que rizobactérias produtoras de AIA promovam a inibição do crescimento radicular, devido à estimulação da síntese de etileno (GLICK et al., 1998).

Na tabela 5, que mostra o comprimento do sistema radicular aos 40 dias após a emergência das plântulas, nota-se que não houve diferença, nessa variável, entre as partes com e sem patógeno de um mesmo sistema radicular, na ausência das rizobactérias. No entanto, houve diferença entre ambos quando se considerou a massa de matéria seca. Isso indica que o comprimento do sistema radicular não foi uma variável adequada para se avaliar o efeito do patógeno sobre as plantas. A concentração de zoósporos inoculados neste primeiro experimento foi de $7,5.10^4/\text{mL}^{-1}$ de suspensão. Essa quantidade de zoósporos está dentro do padrão utilizado em outros estudos que vai de 10^3 a 10^6 (CHEN et al., 1998; ONGENA et al., 1999; UTKHEDE et al., 2000).

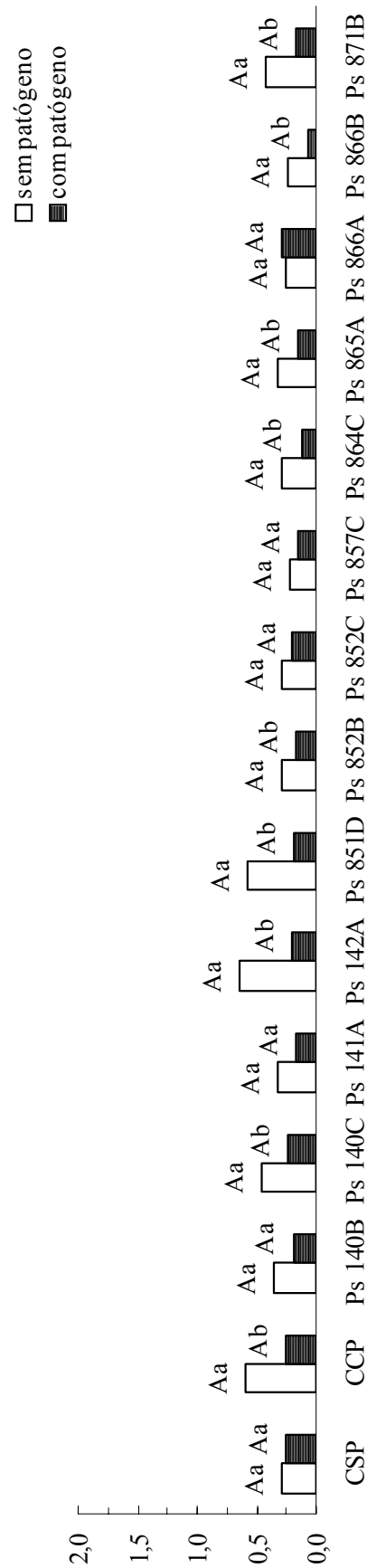


Figura 4. Massa de matéria seca (g) das raízes de pepino cultivadas em sistema hidropônico pela técnica de raízes subdivididas, em que uma parte recebeu o inóculo de *P. aphani dermatum* e a outra parte não o recebeu, com o inóculo de diferentes rizobactérias. Médias de 4 repetições. Experimento 1.

* CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno.

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphani dermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

Tabela 5. Comprimento radicular (cm) e comprimento da lesão (cm) nas raízes das plantas de pepino que receberam o inóculo de *P. aphanidermatum* e de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. Médias de 4 repetições. Experimento 1.

Tratamentos ⁽¹⁾	Comp. radicular		Comp. da lesão	
	S/Pyt. ⁽²⁾	C/Pyt.	S/Pyt. ⁽²⁾	C/Pyt.
CSP	30,3 Aa	32,0 Aa	0,0 Ab	0,0 Da
CCP	26,7 Aa	20,5 Aa	0,0 Ab	18,3 ABCa
Ps 140B	45,0 Aa	27,3 Ab	0,0 Ab	18,1 ABCa
Ps 140C	28,3 Aa	23,0 Ab	0,0 Ab	17,0 ABCa
Ps 141A	31,3 Aa	20,7 Aa	0,0 Ab	11,7 Ca
Ps 142A	39,0 Aa	20,3 Ab	0,0 Ab	16,3 ABCa
Ps 851D	36,2 Aa	20,2 Aa	0,0 Ab	18,2 ABCa
Ps 852B	29,3 Aa	20,7 Ab	0,0 Ab	16,0 ABCa
Ps 852C	27,6 Aa	30,0 Aa	0,0 Ab	13,5 ABCa
Ps 857C	35,3 Aa	25,3 Ab	0,0 Ab	17,5 ABCa
Ps 864C	38,0 Aa	24,0 Ab	0,0 Ab	23,0 Aa
Ps 865A	33,3 Aa	23,7 Aa	0,0 Ab	14,5 ABCa
Ps 866A	24,0 Aa	22,0 Aa	0,0 Ab	19,6 ABCa
Ps 866B	25,0 Aa	16,5 Bb	0,0 Ab	12,6 BCa
Ps 871B	34,1 Aa	23,5 Ab	0,0 Ab	21,8 ABa

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de inoculação com bactérias, na vertical; letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactérias, os tratamentos com e sem patógeno, na horizontal.

⁽¹⁾CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno;

⁽²⁾ S/Pyt.: sem *Pythium aphanidermatum*; C/Pyt.: com *Pythium aphanidermatum*.

O único efeito de um isolado sobre o comprimento do sistema radicular foi o do Ps 866B, que foi negativo, como se o isolado tivesse atuado como um patógeno, reduzindo o comprimento radicular. O único composto produzido pelo isolado Ps 866B foi a β -1,3 glucanase (Tabela 4), cuja ação de destruição da parede celular do patógeno só poderia ser exercida se ambos não estivessem separados espacialmente. Além disso, os isolados Ps 864C, Ps 866A e Ps 871B, também produtores dessa enzima, não influenciaram o crescimento radicular, observado pelas variáveis massa de matéria seca e comprimento.

Quanto à largura do sistema radicular, as partes que receberam o patógeno, identificadas como CCP, não diferiram das partes que não o receberam (Figura 5). Isso quer dizer que a largura do sistema radicular também não se constituiu em uma variável segura para avaliar o efeito de *P. aphanidermatum* sobre as plantas. Não foi encontrado na literatura trabalho que tenha utilizado essa variável para avaliação da severidade da doença.

Nenhum isolado bacteriano resultou na diminuição do comprimento da lesão provocada pelo patógeno (Tabela 5). O isolado Ps 864C obteve o maior comprimento de lesão, sendo que os tratamentos com os isolados Ps 141A e Ps 866B, diferiram deste por apresentarem menor comprimento de lesão, porém não diferiram estatisticamente do tratamento CCP. Todos os tratamentos que foram expostos ao patógeno diferiram dos que não receberam a aplicação do inóculo de *P. aphanidermatum*.

Nas variáveis nota e porcentagem de escurecimento das raízes pelo patógeno os isolados Ps 141A e Ps 865A obtiveram os menores valores, mas não chegaram a diferir do CCP (Tabela 6). Os mesmos isolados não mostraram diferenças entre os conjuntos radiculares expostos ou não ao patógeno em ambas as variáveis, o que evidencia que a nota e a porcentagem de escurecimento das raízes foram variáveis mais adequadas. O propósito da utilização dessas variáveis foi avaliar o progresso da doença sobre o tecido radicular. A doença causada por *P. aphanidermatum* é caracterizada pela colonização das raízes pelas hifas do patógeno, que secretam enzimas, como a celulase, provocando a degradação dos tecidos e o surgimento dos diferentes sintomas, dentre os quais o escurecimento, sintoma típico da doença (KRUGNER & BACCHI, 1995).

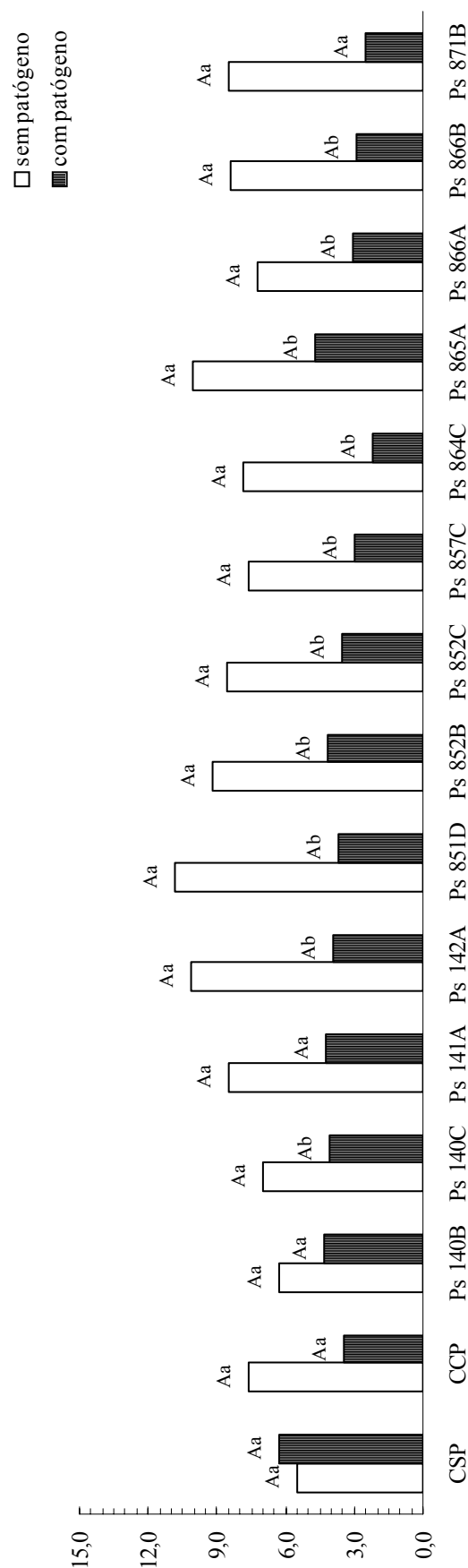


Figura 5. Largura do sistema radicular (cm) 40 dias após a emergência das plantas de pepino que receberam a aplicação de treze isolados de bactérias fluorescentes de *Pseudomonas* spp., em sistema hidropônico, em presença e ausência de *P. aphaniidermatum*. Médias de 4 repetições. Experimento 1.

* CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno.

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphaniidermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

Tabela 6. Nota, segundo escala de 1 (nenhum escurecimento radicular) a 4 (raízes muito escurecidas) e porcentagem de escurecimento radicular das plantas de pepino que receberam o inóculo de *P. aphanidermatum* e de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. Médias de 4 repetições. Experimento 1.

Tratamentos	Nota		Escurecimento	
	s/ Pyt. ⁽²⁾	c/ Pyt.	s/ Pyt.	c/ Pyt.
CSP ⁽¹⁾	1,0 Aa	1,0 Ba	0,0 Aa	0,0 Ba
CCP	1,0 Ab	3,37 Aa	0,0 Ab	87,5 Aa
Ps 140B	1,0 Ab	3,37 Aa	0,0 Ab	63,8 Aa
Ps 140C	1,0 Ab	3,17 Aa	0,0 Ab	65,0 Aa
Ps 141A	1,0 Aa	2,37 ABa	0,0 Aa	58,8 ABa
Ps 142A	1,0 Ab	2,82 Aa	0,0 Ab	63,3 ABa
Ps 851D	1,0 Ab	3,75 Aa	0,0 Ab	88,8 Aa
Ps 852B	1,0 Ab	3,75 Aa	0,0 Ab	63,8 Aa
Ps 852C	1,0 Ab	3,00 Aa	0,0 Ab	63,8 Aa
Ps 857C	1,0 Ab	3,50 Aa	0,0 Ab	68,8 Aa
Ps 864C	1,0 Ab	3,75 Aa	0,0 Ab	96,3 Aa
Ps 865A	1,0 Aa	2,50 ABa	0,0 Aa	58,8 ABa
Ps 866A	1,0 Ab	3,50 Aa	0,0 Ab	85,0 Aa
Ps 866B	1,0 Ab	3,50 Aa	0,0 Ab	78,3 Aa
Ps 871B	1,0 Ab	3,37 Aa	0,0 Ab	88,8 Aa

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de inoculação com bactérias, na vertical; letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactérias, os tratamentos com e sem patógeno, na horizontal.

⁽¹⁾CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno;

⁽²⁾ S/Pyt.: sem *Pythium aphanidermatum*; C/Pyt.: com *Pythium aphanidermatum*.

4.3.2 Segundo experimento

No segundo experimento, somente o isolado Ps 45A diferiu do tratamento CSP em relação à massa de matéria seca da parte aérea (dados não mostrados). As plantas de pepino tratadas com esse isolado tiveram sua massa reduzida. O isolado Ps 45A, produtor de β -1,3 glucanase, foi benéfico no experimento com alface, promovendo maior crescimento das plântulas na presença do patógeno, provavelmente pelo controle direto do *P. aphanidermatum*. Isolados que apresentam habilidade para a supressão de patógenos *in vitro* nem sempre mantêm essa característica em ensaios *in vivo* (BAKKER et al, 1987). Segundo WELLER (1988), uma das causas desse comportamento ambíguo seria a manipulação excessiva das colônias pertencentes ao grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. *in vitro* para a avaliação de sua capacidade como agente de biocontrole. Possivelmente, devido a mudanças na fisiologia das células da colônia. Bactérias quando isoladas da rizosfera possuem uma cápsula de exopolissacarídeos (EPS), mas, quando cultivadas *in vitro*, devido a sua rápida multiplicação, essa estrutura, geralmente se perde, surgindo mutantes deficientes em EPS.

As massas da matéria seca das raízes que receberam os tratamentos bacterianos, em ausência do patógeno, não apresentaram diferenças entre si (Figura 6). Também na presença do patógeno nenhum isolado diferiu do tratamento CCP. Embora dentre os isolados testados houvesse rizobactérias que demonstraram capacidade de controlar *P. aphanidermatum in vitro*, assim como promotores de crescimento. Nenhuma característica referentes a essas propriedades foi observada no experimento *in vivo*, novamente lembrando que nos experimentos *in vitro* utilizaram-se plantas de alface e, nos *in vivo*, de pepino.

As plantas tratadas com os isolados Ps 44A, Ps 140B, Ps 141A e Ps 143C não apresentaram diferenças da massa de matéria seca das raízes sem e com patógeno. Todos esses isolados resultaram em algum efeito benéfico no experimento *in vitro*. Na determinação de metabólitos produzidos por essas rizobactérias, somente o isolado Ps 44A foi produtor de β -1,3 glucanase. Como anteriormente comentado, não se pode associar qualquer efeito observado nas avaliações com plantas tratadas com os isolados produtores de β -1,3 glucanase, devido às discrepantes respostas obtidas. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que a β -1,3 glucanase deveria atuar sobre o patógeno quando

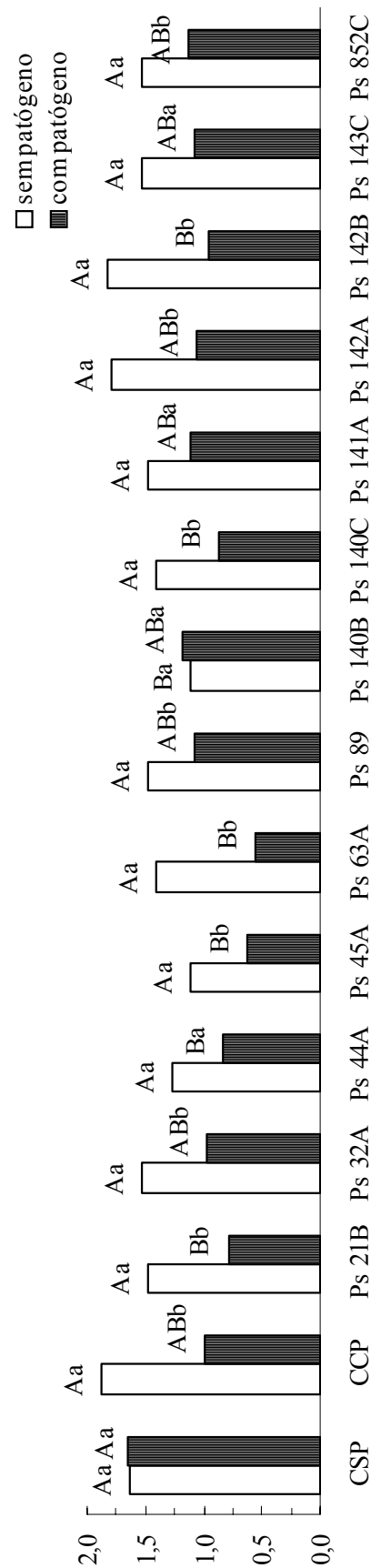


Figura 6. Massa de matéria seca (g) das raízes de pepino cultivadas em sistema hidropônico pela técnica de raízes subdivididas, em que uma parte recebeu o inóculo de *P. aphani dermatum* e a outra parte não o recebeu, com o inóculo de diferentes rizobactérias. Médias de 4 repetições. Experimento 2.

* CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno.

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphani dermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

ambos estão em contato, o que não foi o caso nos experimentos com raízes subdivididas.

Quanto ao comprimento radicular na ausência do patógeno (Tabela 7), nenhum isolado foi capaz de promover maior desenvolvimento radicular, assim como no primeiro experimento. Apenas as plantas tratadas com o isolado Ps 45A apresentaram menor comprimento radicular, diferindo de todos os demais tratamentos na ausência do patógeno.

Na presença do patógeno, somente o isolado Ps 140B diferiu do tratamento CCP (Tabela 7), resultando em maior comprimento radicular. Considerando-se que, pela aplicação da técnica de raízes subdivididas as rizobactérias e *P. aphanidermatum* estavam separados espacialmente, não haveria o controle direto pela ação de uma possível substância antagônica. Esse efeito poderia vir a ratificar a ocorrência de controle indireto do patógeno por algum mecanismo que estivesse ligado à RSI. O isolado Ps 140B mostrou, *in vitro*, eficácia na promoção de crescimento na ausência do patógeno e controle do *P. aphanidermatum*. Todavia, não se observou, neste experimento, diferença estatisticamente significativa entre as partes do sistema radicular expostas ao patógeno e as não expostas, quando se considera o comprimento radicular, no tratamento CCP, em que se pode avaliar o efeito do *P. aphanidermatum* na ausência de outros fatores. Isso invalida a afirmação de que tenha havido RSI pelo isolado Ps 140B, pelo menos quando se utiliza a variável comprimento radicular para avaliar a indução de resistência. Contudo, faz-se necessário acrescentar que, segundo LIU et al. (1995), a aplicação da técnica de "raízes subdivididas" nem sempre é garantia de que a rizobactéria e o patógeno de solo estejam separados espacialmente.

Analizando o efeito da aplicação ou não do patógeno dentro de cada tratamento com as rizobactérias, observou-se que as raízes tratadas com os dez isolados bacterianos não apresentaram diferenças quanto ao comprimento radicular em relação às partes expostas ao patógeno. Contudo, o tratamento CCP também apresentou esse comportamento. Isso leva a deduzir mais uma vez que essa variável foi inadequada para se constatarem diferenças significativas, conforme foi notado, também, no experimento anterior.

O número de zoósporos presentes na suspensão aplicada foi de $3,4 \cdot 10^4$ /mL, não diferindo da concentração utilizada no primeiro experimento, adequada para causar a doença.

Tabela 7. Comprimento radicular (cm) e comprimento da lesão nas raízes (cm) das plantas de pepino que receberam o inóculo de *P. aphanidermatum* e de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. Médias de 4 repetições. Experimento 2.

Tratamentos ⁽¹⁾	Comp. radicular		Comp. da lesão	
	S/Pyt. ⁽²⁾	C/Pyt.	S/Pyt. ⁽²⁾	C/Pyt.
CSP	40,5 ABa	40,2 Aa	0,0 Ab	0,0 Ba
CCP	38,5 ABa	28,1 BCDA	0,0 Ab	26,6 Aa
Ps 21B	42,1 ABa	25,8 Db	0,0 Ab	18,1 Aa
Ps 32A	40,5 ABa	33,7 ABCDb	0,0 Ab	23,2 Aa
Ps 44A	40,3 ABa	32,0 ABCDA	0,0 Ab	19,7 Aa
Ps 45A	25,5 Ca	27,0 CDA	0,0 Ab	20,7 Aa
Ps 63A	41,2 ABa	28,2 BCDA	0,0 Ab	24,5 Aa
Ps 89	43,7 Aa	38,2 ABa	0,0 Ab	22,2 Aa
Ps 140B	42,5 ABa	40,8 Aa	0,0 Aa	16,7 ABa
Ps 140C	37,0 Ba	32,7 ABCDA	0,0 Ab	12,5 ABa
Ps 141A	38,6 ABa	37,5 ABCa	0,0 Aa	17,7 Aa
Ps 142A	41,1 ABa	34,5 ABCDA	0,0 Ab	25,0 Aa
Ps 142B	41,3 ABa	37,5 ABCb	0,0 Ab	28,3 Aa
Ps 143C	39,0 ABa	37,5 ABCa	0,0 Ab	18,6 Aa
Ps 852C	42,1 ABa	35,5 ABCDA	0,0 Ab	13,3 ABa

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de inoculação com bactérias, na vertical; letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactérias, os tratamentos com e sem patógeno, na horizontal.

⁽¹⁾CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno;

⁽²⁾ S/Pyt.: sem *Pythium aphanidermatum*; C/Pyt.: com *Pythium aphanidermatum*.

Parasitas necrotróficos como *P. aphanidermatum*, destroem o tecido vegetal, levando ao colapso das funções fisiológicas normais. O aumento da taxa de respiração e a diminuição da taxa de fotossíntese são funções fisiológicas básicas alteradas pelo ataque de um patógeno, prejudicando o crescimento da planta (LEITE & PASCHOLATI, 1995). Esperava-se que as variáveis massa de matéria seca, comprimento e largura radicular fossem efetivas na detecção da expressão dos resultados dos tratamentos; contudo somente o primeiro parâmetro, a massa de matéria seca, foi eficiente em ambos os experimentos.

As plantas que receberam a aplicação do isolado Ps 21B apresentaram os valores mais baixos em relação à largura do sistema radicular tanto na presença quanto na ausência do patógeno (Figura 7), mas essa diferença não chegou a ser significativa em relação ao tratamento CCP. O isolado Ps 21B, produtor de HCN e AIA, diferiu do tratamento CSP pela reduzida largura do sistema radicular na ausência do patógeno. Embora, a planta tratada com o isolado Ps 21B tenha apresentado menor largura do sistema radicular, não chegou a diferir do tratamento CCP. Esse foi o único isolado produtor de HCN testado no experimento *in vivo*; pode ser que a produção do HCN tenha provocado um estresse na planta.

Nas variáveis comprimento da lesão (Tabela 7), nota e escurecimento (Tabela 8), nenhum tratamento diferiu do tratamento CCP à exceção do tratamento CSP. Porém, o isolado Ps 141A diferiu dos tratamentos Ps 21B, Ps 45A e Ps 63A que apresentaram maior escurecimento segundo o padrão estabelecido na escala de notas e, também, maior porcentagem de escurecimento.

SILVA (2002), visando ao controle de enfermidades por RSI, isolou da rizosfera e/ou rizoplane de tomateiros cultivados em diferentes regiões, 500 rizobactérias. A partir de testes realizados em laboratório e casa-de-vegetação com todas as rizobactérias isoladas, chegou-se a um isolado de *Bacillus cereus* (UFV-101), que reduziu a ocorrência natural de doenças em relação aos demais tratamentos em experimentos em casa-de-vegetação e no campo. Das 60 rizobactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. escolhidas para o teste em alface, neste trabalho, 21 foram selecionadas para o teste em casa de vegetação. Possivelmente, o desenvolvimento de maiores estudos, com a adoção de um número maior de rizobactérias testadas, inclusive isoladas da rizosfera da própria cultura, além do uso de novas variáveis, possa facilitar a observação da ocorrência da RSI.

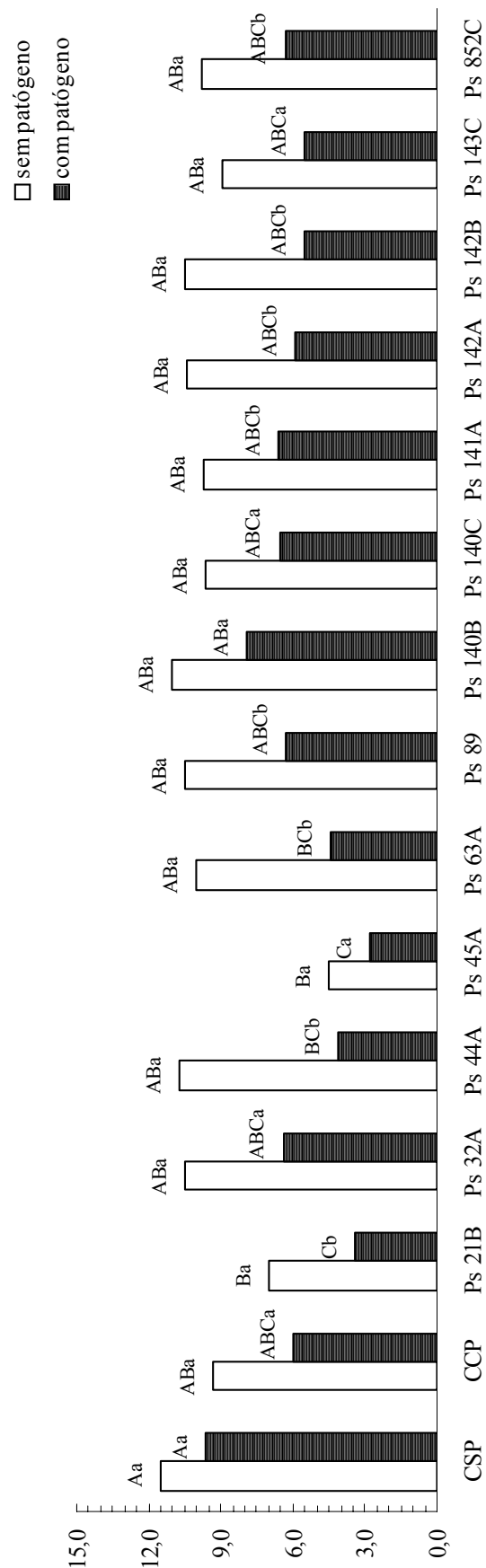


Figura 7. Largura do sistema radicular (cm) 40 dias após a emergência das plantas de pepino que receberam a aplicação de treze isolados de bactérias fluorescentes de *Pseudomonas* spp., em sistema hidropônico, em presença e ausência de *P. aphaniidermatum*. Médias de 4 repetições. Experimento 2.

* CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno.

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey). Letras maiúsculas comparam, entre tratamentos, o efeito da inoculação das rizobactérias (sem patógeno) e do *P. aphaniidermatum* (com patógeno). Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno.

Tabela 8. Nota, segundo escala de 1 (nenhum escurecimento radicular) a 4 (raízes muito escurecidas) e porcentagem de escurecimento radicular das plantas de pepino que receberam o inóculo de *P. aphanidermatum* e de bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. Médias de 4 repetições. Experimento 2.

Tratamentos	Nota		Escurecimento	
	s/ Pyt. ⁽²⁾	c/ Pyt.	s/ Pyt.	c/ Pyt.
CSP ⁽¹⁾	1,0 Aa	1,0 Ca	0,0 Aa	0,0 Ba
CCP	1,0 Ab	3,37 ABa	0,0 Ab	88,0 Aa
Ps 21B	1,0 Ab	3,50 Aa	0,0 Ab	71,0 Aa
Ps 32A	1,0 Ab	3,25 ABa	0,0 Ab	66,0 Aa
Ps 44A	1,0 Ab	3,00 ABa	0,0 Aa	64,0 Aa
Ps 45A	1,0 Ab	3,62 Aa	0,0 Ab	76,0 Aa
Ps 63A	1,0 Ab	3,50 Aa	0,0 Ab	80,0 Aa
Ps 89	1,0 Aa	2,62 ABa	0,0 Ab	63,0 Aa
Ps 140B	1,0 Aa	2,62 ABa	0,0 Aa	51,0 ABa
Ps 140C	1,0 Ab	2,62 ABa	0,0 Aa	39,0 ABa
Ps 141A	1,0 Aa	2,12 BCa	0,0 Aa	41,0 ABa
Ps 142A	1,0 Ab	3,12 ABa	0,0 Ab	75,0 Aa
Ps 142B	1,0 Ab	3,25 ABa	0,0 Ab	77,0 Aa
Ps 143C	1,0 Ab	3,00 ABa	0,0 Ab	53,0 ABa
Ps 852C	1,0 Ab	2,75 ABa	0,0 Ab	38,0 ABa

Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de inoculação com bactérias, na vertical; letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactérias, os tratamentos com e sem patógeno, na horizontal.

⁽¹⁾CSP: controle sem patógeno; CCP: controle com patógeno;

⁽²⁾ S/Pyt.: sem *Pythium aphanidermatum*; C/Pyt.: com *Pythium aphanidermatum*.

5 CONCLUSÕES

- a) Alguns isolados foram benéficos ao crescimento tanto do hipocótilo quanto da raiz de plantas de alface, na ausência e na presença de *Pythium aphanidermatum*;
- b) Dois isolados - Ps 140B e Ps 141A - propiciaram desenvolvimento das raízes expostas ao patógeno e das não expostas a ele, sugerindo uma possível indução de resistência sistêmica;
- c) Não foi constatada nenhuma correspondência entre a produção de metabólitos pelos isolados bacterianos e a promoção de crescimento e/ou controle biológico nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.
- d) O comprimento e largura radicular não se constituíram em variáveis seguras para avaliar o efeito de *P. aphanidermatum* sobre as plantas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v.37, p. 495-501, 1991.
- BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERI, G.; NOYA, F.; ARIAS, A. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.10, p.1317-1322, 1998.
- BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonads* spp. mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 451-457, 1987.
- BENHAMOU, N.; BELÁNGER, R. R.; PAULITZ, T. C. Pre-inoculation of *Ri* T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow: an ultrastructural study. **Planta**, v. 199, p. 105-117, 1996.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 717-728, 1995.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de Resistência: Noções Básicas e Perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. FEALQ, Piracicaba, SP. p. 11-28, 2005.
- BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTON, S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 535-538, 1991.
- BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. Gram-negative aerobic rods and cocci. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (Eds). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, 1268p, 1974.
- CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A Rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds). Microbiologia do Solo, Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 41-57, 1992.
- CARDOSO, A. I. I.; SILVA, N. Avaliação de híbridos de pepino tipo japonês sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo. **Horticultura Brasileira**, v. 21, nº 2, p. 136-141, 2003.
- CATTELAN, A. J. Antagonismo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente a fungos fitopatogênicos de solo e de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 37-42, 1994.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Induced systemic resistance (IRS) by *Pseudomonas* spp. impairs pre- and post-infection development of *Pythium aphanidermatum* on cucumber roots. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 877-886, 1998.

CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 477-486, 1999.

CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p.13-23, 2000.

CHÉRIF, M.; BÉLANGER, R. R. Use of potassium silicate amendments in recirculating nutrient solutions to suppress *Pythium ultimum* on long English cucumber. **Plant Disease**, v. 76, p. 1008-1011, 1992.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; VAN DEN BROEK, D.; VOER, G.; VAN DER DRIFT, K.; TUINMAN, S. Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. **Molecular Plant and Microbe Interactions**, v. 14, p. 969-979, 2001.

COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, v.75, p.25-29, 1985.

DOWLING, D. N.; O'GARA, F. Metabolites of Pseudomonads involved in the biocontrol of plant disease. **Trends Biotechnology**, v. 12, n. 04, p. 133-141, 1994.

DUIJFF, B.; MEIJER, J.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Neth Journal Plant Pathology**, v. 99, p.277-289, 1997.

FERREIRA, L. P.; SALGADO, C. L. Bactérias. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 97-131, 1995.

FRAVEL, D. R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p.75-91, 1988.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.6, p. 987-994, 2004.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.1211-1221, 1993.

FURLANI, P. R. Hydroponic vegetable production in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 481, p. 777-778, 1999.

FURLANI, P. R.; SILVEIRA, L. C. P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIN, V. Cultivo hidropônico de Plantas. Campinas. Instituto Agrônômico, (Boletim Técnico, 180), 52p., 1999.

GEELS, F. P.; SCHIPPERS, B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. **Journal of Phytopathology**, v. 108, p. 193-206, 1983.

GLICK, B. R., PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal Theoreme Biology**, v. 190, p. 63-68, 1998.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951.

GREENBERG, J. A factor in agar which reverses the antibacterial activity of 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. **Nature**, v. 88, p. 660, 1969.

GUTTERSON, N. Microbial fungicides - recent approaches to elucidating mechanisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.10, n.1, p.69-91, 1990.

GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas a patogênese. In: LUZ, W.C. (ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 11, p.283-332, 2003.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 117-153, 2003.

HALLMANN, J.; QUANDT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANUS, F. J.; SANDS, J. G.; BENNETT, E. O. Antibiotic activity in the presence of agar. **Applied of Microbiology**, v. 15, p. 31-34, 1967.

HENDRIX J.R., F. F.; CAMPBELL, W. A. *Pythium* as plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.73, p. 77-98, 1973.

HOFFLAND, E.; BIK, L. *Pseudomonas*-induced resistance against *Fusarium* wilt. In: International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, Int. Soc. **Plant Pathology**, p.216 (abstr), 1993.

HOFFLAND, E.; PIETERSE, C. M. J.; BIK, L.; VAN PELT, J. A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. **Physiology Molecular and Plant Pathology**, v. 46, p. 309-320, 1995.

JONES, S. W.; DONALDSON, S. P.; DEACON, J. W. Behaviour of zoospores and zoospore cysts in relation to root infection by *Pythium aphanidermatum*. **New Phytopathology**, v. 117, p. 289-301, 1991.

KEEN, N. T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? **Science**, v. 187, p. 74-75, 1975.

KIMATI, H.; BERGAMIM FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 692-709, 1995.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. 2 simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of laboratory and clinical medicine**, v.44, n.2, p.301-307, 1954.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proceeding 4th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, v. 2, p. 879-882, 1978.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M. N. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. **Current of Microbiology**, v. 04, p. 317-320, 1980.

KREMER, R. J.; SOUISSI, T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. **Current of Microbiology**, v. 43, p. 182-186, 2001.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 46-95, 1995.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 393-414, 1995.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 85, n° 6, p.695-698, 1995.

LOPPER, J. E. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. **Phytopathology**, v. 78, p.166-172, 1988.

LOPPER, J. E.; SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. **Phytopathology**, v. 74, p.1454-1460, 1984.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 04, p. 01-49, 1996.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: Resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p.121-137, 2000.

MAURFHOFFER, M.; HASE, C.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J. P.; DÉFAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gac A* gene and pioverdine production. **Phytopathology**, v. 84, p.39-46, 1994.

MÉTRAUX, J. P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W.; INVERARDI, B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v. 250, p.1004-1006, 1990.

MEYER, J. M.; ABDALLAH, M. A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. **Journal of General Microbiology**, v. 107, p.319-328, 1978.

MISCHUSTIN, E. N.; NAUMOVA, A. N. Bacterial fertilizers and their effectiveness. **Mikrobiologiya**, v. 31, p.543-555, 1962.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 06, p.261-284, 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds). Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras, MG, UFLA. p.361-397, 2002.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C.; CORNÉLIS, P.; KOEDAM, N.; BÉLANGER, R. R. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. **Plant Pathology**, v. 48, p.66-76, 1999.

OWEN-GOING, N.; SUTTON, J. C.; MAFFIA, L. A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 5, p.439-448, 2003.

PARK, K. S.; KLOEPPER, J. W. Activation of PR-1a promoter by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Biological Control**, v. 18, p.2-9, 2000.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p.1-37, 1994.

PAULITZ, T. C.; ZHOU, T.; RANKIN, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. **Biological Control**, v. 02, p. 226-237, 1992.

PAULITZ, T. C. Biological control of root rot pathogens in soilless and hidroponic systems. **HortScience**, v. 32, n.2, p. 193-196, 1997.

PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **Plant Cell**, v. 8, p.1225-1237, 1996.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 10, p.1571-1580, 1998.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KEURENTJES, J. J. B.; VERHAGEN, B. W. M.; KNOESTER, M.; VANDER SLUIS, I.; BAKKER, P. A. H. M.; VAN LOON, L. C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p.63-68, 2001.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; OOSTEN, V. V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; VAN LOON, L. C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 13, p.277-295, 2005.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. FEALQ. Piracicaba. 309p., 2002.

QUANT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p.577-582, 1997.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p.524-532, 1991.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Controle Biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 11, p.195-228, 2003.

ROMEIRO, R. S. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal como indutores de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. FEALQ, Piracicaba, SP. p.169-182, 2005.

SHANAHAN, P.; OSULLIVAN, D. J.; SIMPSON, P.; GLENNON, J. D.; OGARA, F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological-parameters influencing its production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n.1, p.353-358, 1992.

SILVA, H. S. A. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares e como promotoras de crescimento em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). 2002. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 78p.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. **Science**, v. 117, p.949- 959, 1972.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A. W.; BAKKER, P. A. H. M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 25, p.339-358, 1987.

SLININGER, P. J.; JACKSON, M. A. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p.388-392, 1992.

SONNENBERG, P. E. Cucurbitáceas. In: SONNENBERG, P. E. (Ed.). Olericultura Especial - 2º Parte, Goiânia, GO, p.135-146, 1985.

SOTTERO, A. N. Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias. 2003. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico, Campinas. 47p.

STANGHELLINI, M. E.; RASMUSSEN, S. L. Hydroponics - A solution for zoosporic pathogens. **Plant Disease**, v. 78, n. 12, p.1129-1138, 1994.

STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 159-271. 1996.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p.235-270, 1997.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p.183-190, 2000.

TOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; BONSALE, R. F.; PIERSON, L. S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 56, p.908-912, 1990.

TOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3499- 3508, 1988.

UTKHEDE, R. S.; LÉVESQUE, C. A.; DINH, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 22, p.138-144, 2000.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p.453-483, 1998.

VAN PEER, R.; NIEMAN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, v. 81, p.728-734, 1991.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonas against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, p.1-10, 2002.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DEFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root-rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **Embo Journal**, v. 8, n. 2, p.351-358, 1989.

WEI, G.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 81, p.1508-1512, 1991.

WELLER, D. M. Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p.379-407, 1988.

WEST, P. V.; APPIAH, A. A. A; NEIL, A. R.G. Advences in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 1, p.99-113, 2003.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, Roots Special Issue, pp.487-511, 2001.

YANEZ, L. D. T. Identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos *in vitro* de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). 2000. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.74p.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Embrapa Agrobiologia. Seropédica. 32p. (Documentos, 127). 2000.

ZEHNDER, G. W.; MURPHY, J. F.; SIKORA, E. J.; KLOEPPER, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p.39-50, 2001.

ZDOR, R. E.; ANDERSON, A. J. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of beans. **Plant and Soil**, v. 140, n. 1, p.99-107, 1992.

ZHOU, T.; PAULITZ, T. C. Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber. **Journal of Phytopathology**, v. 142, p.51-63, 1994.