



**DISSERTAÇÃO**

**POTENCIAL DE *Pseudomonas* spp NA PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO E NO CONTROLE DE *Pythium*  
EM ALFACE CULTIVADA EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

**MATHEUS APARECIDO PEREIRA CIPRIANO**

**Campinas, SP**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Instituto agronômico**

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

**POTENCIAL DE *Pseudomonas* spp. NA PROMOÇÃO  
DE CRESCIMENTO E NO CONTROLE DE *Pythium*  
EM ALFACE CULTIVADA EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

**MATHEUS APARECIDO PEREIRA CIPRIANO**

**Orientadora: Dra. 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 2009**

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônomo

C577p Cipriano, Matheus Aparecido Pereira  
Potencial de *Pseudomonas* spp. na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico / Matheus Aparecido Pereira Cipriano. Campinas, 2009. 49 fls.

Orientadora: Dra. Sueli dos Santos Freitas  
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)  
– Instituto Agrônomo

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

CDD. 635.52

Aos meus pais Maria Inês e João Edson

pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida,

**DEDICO**

À Sueli dos Santos Freitas

pela valiosa amizade,

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

- À Dra. Sueli dos Santos Freitas, pela excelente orientação, indispensável dedicação, valiosos ensinamentos e amizade.
- À Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício, pelos conselhos, ensinamentos, estímulo à pesquisa e amizade.
- À Dra. Adriana Parada Dias da Silveira, pelos ensinamentos, sugestões e amizade.
- À Ana Flávia Mangeti Metzner, pelo convívio, ajuda na execução dos experimentos, e principalmente pela amizade.
- A todos os amigos e funcionários que contribuíram não só na execução deste trabalho, em algum momento, mas também permitiram que fosse desenvolvido com muito prazer: Bárbara, Fabiana, Julia, Rosana, Marcelo Sekita e Zayame.
- Ao Dr. José Antônio de Fátima Esteves, pelos conhecimentos compartilhados.
- Aos outros amigos que não participaram diretamente deste trabalho, mas cujo convívio, apoio e amizade nunca serão esquecidos: Daniel, Leandro, Ludmila, Paula, Renata, Ricardo Previdente, Ricardo Brasil, Sylvia, Thabata.
- A todos os funcionários da PG-IAC, pela atenção dedicada e aos professores pelos conhecimentos adquiridos.
- À FAPESP, pela bolsa e pelo auxílio concedidos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 O cultivo de alface em hidroponia.....	2
2.2 Doenças em alface hidropônica.....	4
2.3 <i>Pythium</i> spp. em sistemas hidropônicos.....	4
2.4 Controle biológico e promoção de crescimento de plantas.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1 Microrganismos.....	14
3.2 Promoção de crescimento e controle biológico <i>in vitro</i> .....	14
3.3 Sistema hidropônico e obtenção de mudas de alface.....	16
3.3.1 Obtenção de suspensão bacteriana de <i>Pseudomonas</i> spp.....	17
3.3.2 Obtenção de zoósporos de <i>Pythium</i> sp.....	18
3.3.3 Verificação de indução de resistência (IR).....	19
3.3.4 Interação de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Pythium</i> sp.....	20
3.3.5 Isolamento a partir de raízes e plaqueamento da solução nutritiva.....	21
3.3.6 Avaliação.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Testes <i>in vitro</i> – promoção de crescimento e controle biológico.....	22
4.2 Testes <i>in vivo</i> .....	27
4.2.1 Indução de resistência e efeito da interação de rizobactérias e <i>Pythium</i> sp.....	27
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

CIPRIANO, Matheus Aparecido Pereira. **Potencial de *Pseudomonas* spp. na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico.** 2009. 49f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Pós-Graduação – IAC.

## RESUMO

A alface é a hortaliça folhosa mais produzida em sistemas hidropônicos. Esse sistema traz algumas vantagens e diminui as chances de ocorrência de doenças causadas por patógenos veiculados pelo solo. No entanto, apresenta um problema, com espécies do gênero *Pythium*, causando podridão de raízes. O controle de *Pythium* em sistemas hidropônicos é difícil, sendo que a melhor forma de controlar os prejuízos causados pelo patógeno é evitar que ele se instale no sistema. Uma forma alternativa viável e promissora no controle do *Pythium* em sistemas hidropônicos é o controle biológico por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), com destaque para as pertencentes ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*. Os objetivos do trabalho foram: verificar se isolados de *Pseudomonas* spp. promovem o crescimento de plantas de alface, possuem potencial como agentes de controle biológico de *Pythium* em sistema hidropônico de cultivo e verificar se ocorre correspondência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vitro* placas de Petri com meio de cultura ágar-água receberam 10 sementes de alface tratadas, separadamente, com suspensão dos isolados de *Pseudomonas* spp.; para os testes de controle biológico, foi adicionado no centro da placa um disco de meio de cultura V8 com micélio do patógeno. As placas foram mantidas a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas, durante cinco a sete dias. Decorrido o tempo de incubação foram avaliados os comprimentos do hipocótilo e radícula, com cinco repetições de cada tratamento. Nos testes *in vivo*, plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico receberam suspensão com os isolados dos antagonistas e, após uma semana, suspensão de zoósporos de *Pythium*. As variáveis analisadas foram escurecimento das raízes, massa de matéria seca da parte aérea e da raiz. Concluiu-se que rizobactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. possuem potencial para controle biológico de *Pythium* e promoção de crescimento em alface hidropônica e constatou-se correspondência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Pythium*, controle biológico, rizobactérias



CIPRIANO, Matheus Aparecido Pereira. **Potential of *Pseudomonas* spp. on growth promotion and biological control of *Pythium* in lettuce cultivated in hydroponic systems.** 2009. 49p. Dissertation (Master degree in Tropical and Subtropical Agriculture) – Post Graduation – IAC.

## ABSTRACT

Lettuce is the vegetable most deal in hydroponic systems. This system has some advantages and reduces the occurrence of diseases caused by soil-borne pathogens. But there is a problem with *Pythium* species that cause root rot. The control of this pathogen in hydroponic system is difficult, and the best way to control it is to avoid its introduction in the system. A promising alternative to control *Pythium* in hydroponics systems is the biological control by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), like the fluorescent group of genus *Pseudomonas*. The aim of the study were evaluate if pseudomonad isolates promote growth of lettuce plants, if they have potential as biological control of *Pythium* sp. in hydroponic systems and evaluate if there is correspondence between *in vitro* and *in vivo* results. In the *in vitro* tests Petri dishes with medium agar-water received ten seeds of lettuce treated, separately, with isolates of pseudomonad suspension, and for the biological control tests, a disc of V8 medium with mycelium of the pathogen was added. The plates were incubated at  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  with 12 hours photoperiod, through a period between five and seven days. After this time the hypocotyls and primary roots length were evaluated, with five repetitions by treatments. In the *in vivo* tests, lettuce plants cultivated in hydroponic systems received a suspension of antagonists isolates and, after one week, zoospores suspension of *Pythium*. The variables of root discolored, root and shoot dry weights were analyzed. Isolates of rizobactéria have potential for biological control of *Pythium* and growth promotion of lettuce plants in hydroponic systems and there was correspondence between *in vitro* and *in vivo* tests.

Key words: *Pythium*, biological control, rhizobacteria

# 1 INTRODUÇÃO

A alface é a hortaliça folhosa mais consumida pelos brasileiros, principalmente nas épocas mais quentes do ano. Trata-se também da hortaliça mais produzida em sistemas hidropônicos. Esse sistema consiste no cultivo de plantas em água e os nutrientes necessários ao desenvolvimento são fornecidos por meio de solução nutritiva. Existem diversos tipos de sistemas hidropônicos e cada um é específico para certo tipo de cultura. Para as hortaliças folhosas como alface, o sistema mais utilizado é o “*nutrient film technique*” (NFT), ou técnica de fluxo laminar de nutrientes que consiste em canaletas inclinadas onde as plantas são apoiadas e por elas a solução nutritiva passa de forma contínua ou intermitente.

Esse sistema traz algumas vantagens no cultivo de hortaliças, pois permite redução de mão de obra, e ganho na produtividade, permitindo retorno de capital rápido ao produtor, além de diminuir as chances de doenças causadas por patógenos veiculados pelo solo. No entanto, existe uma comunidade de microrganismos pouco diversa capaz de sobreviver nesse habitat, como espécies do gênero *Pythium*. Algumas espécies desse gênero, que vivem nesse habitat, causam podridão de raízes.

As condições favoráveis desse sistema como altas temperaturas, baixa diversidade biológica, falta de cultivares susceptíveis e outros fatores favorecem a severidade da doença. Uma vez introduzido no sistema hidropônico, o patógeno pode causar danos muitas vezes irreversíveis à planta. Sintomas como escurecimento e podridão das raízes, murcha das folhas e redução do crescimento da planta são causados por esse patógeno.

O controle de *Pythium* em sistemas hidropônicos é difícil, sendo que a melhor forma é evitar a sua introdução no sistema. Um conjunto de medidas sanitárias – que abrange desde sementes de boa qualidade até o local onde o sistema será instalado – é importante para diminuir as chances de introdução do patógeno. Não existem produtos químicos registrados para controle da doença em hidroponia. Dessa forma, o controle biológico é uma alternativa viável e promissora no controle do *Pythium* em sistemas hidropônicos.

Dentre os microrganismos promissores no controle de fitopatógenos, destacam-se as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), com destaque para as pertencentes ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*. A forma como o antagonista controla o desenvolvimento do patógeno nem sempre é elucidada, mas

existem vários mecanismos de controle como antibiose, competição indução de resistência sistêmica, produção de sideróforos, entre outros.

Portanto, o controle biológico é uma opção válida para a agricultura, particularmente nas culturas hidropônicas. Com base nessas informações os objetivos do presente trabalho foram:

- a) avaliar se isolados de rizobactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* promovem o crescimento de plantas de alface e possuem potencial como agentes de controle biológico de *Pythium* em sistema hidropônico de cultivo;
- b) verificar se ocorre correspondência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, de modo a permitir uma avaliação mais expedita da interação de *Pythium* e de rizobactérias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O cultivo de alface em hidroponia

No Brasil, a alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais comercializada, tendo grande aceitação na alimentação humana por ser fonte de vitaminas e sais minerais, principalmente vitamina A (LOPES et al., 2003). Trata-se de uma cultura adaptada a climas amenos, sendo própria para cultivo no inverno, mas seu maior consumo ocorre no verão.

O cultivo hidropônico apresenta-se como uma das alternativas na busca por maior qualidade na produção de hortaliças e preservação do ambiente. Esse tipo de cultivo apresenta uma série de vantagens em relação ao sistema tradicional como: redução de patógenos de solo, melhor aspecto visual e maior durabilidade redução de até 25% da perda de folhas por pé de hortaliças (OHSE, 2001; RODRIGUES, 2002), além de possibilitar menor gasto com insumos agrícolas e água. A alface destaca-se como a principal hortaliça produzida em sistemas hidropônicos, devido à elevada qualidade do produto final, que se apresenta mais tenro, limpo e com maior longevidade após a colheita (YAÑES, 2000).

SANTANA et al. (2006) compararam as características físicas de alfaces oriundas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico, sendo que as de cultivo hidropônico foram as únicas classificadas como “Extra”, que, de acordo com a

legislação de alimentos, corresponde às hortaliças de elevada qualidade, bem desenvolvidas, compactas e firmes. Dentro desse contexto, a cultura ganha cada vez mais espaço na produção hidropônica, provavelmente devido a seu pioneirismo nessa forma diferenciada de cultivo no país, bem como por ter manejo relativamente fácil e principalmente por ser de ciclo curto, garantindo assim retorno de capital mais rápido. Sob ambiente protegido, as plantas não estão expostas a fatores adversos do ambiente, como geadas, chuvas intensas, granizo e ventos fortes, resultando em ganho na produtividade e qualidade, fatores que contribuem para o fornecimento constante aos pontos de venda, trazendo satisfação ao consumidor (LOPES et al., 2003).

Existem vários tipos de sistemas hidropônicos e a cultura de interesse pode ser cultivada em substratos naturais, manipulados, orgânicos ou em água. No cultivo em água, o sistema mais utilizado é o “nutrient film technique”, ou, a técnica do fluxo laminar de nutrientes (NFT). Além desse sistema, existem ainda outras variações no cultivo em água como a aeroponia, sistema “deep flow technique” (DFT) e sistemas hidropônicos experimentais. Dentre os sistemas hidropônicos experimentais, existe o de cultivo em pequenos recipientes, que é referido na literatura como *Container Culture* (CC). Esse sistema é constituído de recipientes plásticos de cultivo com dimensões pequenas e não possui reservatório para solução nutritiva. O arejamento dessa solução é feito continuamente com ar comprimido aplicado diretamente na solução, utilizando bombas de aquário ou compressores quando o número de recipientes é grande. A vantagem de se utilizar esse tipo de sistema hidropônico é a possibilidade de realizar estudos sobre a transmissão de patógenos via solução nutritiva e absorção de nutrientes pela planta (RODRIGUES, 2002).

Outra característica da hidroponia considerada como vantagem é a ausência de solo e dos problemas relacionados aos patógenos por ele veiculados. No entanto, esse sistema propicia condições favoráveis ao desenvolvimento de *Pythium*. Isso ocorre devido à baixa biodiversidade, liberação de exsudatos ricos em carbono, às temperaturas adequadas e fornecimento de oxigênio, além de mecanismos rápidos, eficientes e uniformes de disseminação, pela ausência de competição (ZHANG & TU 2000; RODRIGUES, 2002).

## **2.2 Doenças em alface hidropônica**

No cultivo de alface hidropônica, doenças causadas por *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Sclerotinia* sp., *Bremia latuca*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Septoria lactucae* e o vírus vira-cabeça, transmitido por tripes (RODRIGUES, 2002; LUZ et al., 2006), podem comprometer a qualidade da cultura. Entretanto, no cultivo hidropônico a maior preocupação é quanto às espécies de *Pythium*, agente causal da podridão de raízes.

Patógenos do gênero *Pythium* são introduzidos no sistema hidropônico pela água eventualmente contaminada usada no preparo da solução nutritiva e por mudas contaminadas. O solo pode ser outro veículo de disseminação do patógeno, cujos esporos podem ser transportados pelo vento.

A contaminação do sistema hidropônico por *Pythium* pode levar a grandes perdas na produção de culturas, constituindo-se em fator limitante à produção de alface em todo o mundo (VANACHTER & LEUVEN, 1995).

## **2.3 *Pythium* spp. em sistemas hidropônicos**

Uma característica dos patógenos que determina a capacidade de disseminação é a sua mobilidade, ou seja, o potencial de produzir propágulos que facilitem sua transmissão. Uma dessas possibilidades é a produção de zoósporos, propágulos com flagelos especialmente adequados para locomoção em meio aquático. Dentre os patógenos capazes de produzir zoósporos, espécies de *Pythium* são capazes de causar podridão das raízes e representam uma ameaça à produtividade de diversas culturas em sistemas hidropônicos, incluindo alface, pepino, tomate, espinafre, rúcula, rosa, crisântemo e capuchinha (SUTTON et al., 2006). Em plantas de sistemas hidropônicos, os zoósporos podem encistar e germinar, por meio de tubo germinativo, que penetra nas raízes (HENDRIX & CAMPBELL, 1973; ZHOU & PAULITZ, 1993) e uma vez dentro da planta podem causar modificações em algumas células. OWEN-GOING et al. (2003) verificaram que raízes de plantas de pepino não infectadas por zoósporos de *Pythium* apresentavam células corticais geralmente alongadas, diferentemente das células cujas raízes foram infectadas. As células corticais dessas raízes tornaram-se dilatadas, semelhantes a cubos, e as raízes apresentavam calos, além da elevada quantidade de conteúdo granular.

O cultivo hidropônico reúne condições adequadas para a ocorrência de podridão de raízes por causa, principalmente, da alta temperatura e umidade favoráveis ao patógeno, além do rápido e uniforme mecanismo de disseminação de *Pythium aphanidermatum* (YAÑES, 2000). Além desses fatores, segundo SUTTON et al. (2006), a falta de uma microbiota – associada às raízes da planta e à solução nutritiva – que possa efetivamente antagonizar espécies de *Pythium* contribui para que ocorra a doença. A ausência desses microrganismos competidores cria um vácuo biológico e patógenos dessa espécie, favorecidos pelas condições prevalentes, podem rapidamente crescer e se espalhar na água. Finalmente, as plantas hospedeiras são susceptíveis, principalmente nos estágios juvenis, além de não haver cultivares hortícolas com resistência genética (PAULITZ & BÉLANGER, 2001).

Os sintomas típicos dessa doença podem ser observados pela murcha das folhas, escurecimento das pontas de raízes, seguido de redução e necrose do sistema radicular, podendo resultar em morte da planta. Uma vez introduzida no sistema, sua dispersão é rápida e uniforme, e pode levar a perdas catastróficas. As perdas em alface devido a *P. aphanidermatum* podem ser superiores a 50%, mesmo na ausência de sintomas visíveis de podridão radicular. Estudos feitos por STANGHELLINI & KRONLAND (1986) demonstraram que plantas assintomáticas e aparentemente saudáveis, mas que estavam infectadas por *Pythium* spp., apresentavam redução de vigor e perdas na colheita. Esses resultados corroboram com o de UTKHEDE et al. (2000) que afirmaram ser impossível, em muitos casos, ao produtor detectar a doença em plantas assintomáticas.

O controle de doenças causadas por espécies de *Pythium* em sistemas hidropônicos é difícil, por isso prevenir que o patógeno se instale no sistema é a melhor opção. Uma alternativa de prevenir a doença é o uso de fungicidas. No entanto, estes são eficientes apenas na prevenção, ou seja, antes que ocorra infecção (POSTMA et al., 2000), sendo que não existem produtos registrados para uso em hidroponia (RODRIGUES, 2002). Além disso, a disponibilidade de um fungicida efetivo para uso em solução hidropônica pode ser dificultada devido à toxicidade e ao potencial de resíduos inaceitáveis nas plantas para os consumidores (ZHAO et al., 2000). De acordo com UTKHEDE et al. (2000), fungicidas como metalaxil e fosetil controlam a podridão de raiz causada por *Pythium* spp. Porém, esses produtos não são registrados e em estudos realizados pelos mesmos autores os produtos causaram fitotoxicidade às plantas de alface hidropônica.

O uso de surfactantes no controle da dispersão de zoósporos de *Pythium aphanidermatum* foi investigado por STANGHELINI et al. (1996). Os autores observaram que a adição do surfactante à solução nutritiva controlou a dispersão do patógeno. Isso acontece porque o surfactante provoca lise da parede celular, zoósporos e vesículas. Mas alertam que o resultado satisfatório foi obtido apenas na concentração utilizada em seus experimentos e que, em estudos prévios, verificaram que em alta concentração o elemento causa fitotoxicidade às plantas.

Um conjunto de medidas pode ser adotado para prevenir a contaminação de sistemas hidropônicos por *Pythium* spp. Cuidados como a higiene das mãos, por exemplo, pois uma vez contaminadas, após o contato com uma planta doente, podem disseminar a doença para as plantas saudáveis. A manutenção e a limpeza do sistema também são fatores importantes para evitar contaminação e multiplicação do patógeno. Trata-se de um patógeno saprófita, por isso pode se aproveitar de restos de plantas que estão no sistema para completar seu ciclo de vida. Outro fator que pode comprometer a sanidade das plantas é a má qualidade da água utilizada para preparo da solução nutritiva. Deve-se ter conhecimento sobre os elementos contidos na água que será utilizada, para que esta não comprometa o desenvolvimento da planta, nem seja um possível veículo de disseminação de patógenos. Uma vez contaminada distribui os propágulos do patógeno na solução circulante e pode ter efeito devastador. Outro cuidado que se deve tomar é com o local onde o sistema será instalado. Muitos patógenos de solo podem, por meio de vento, aerossóis provocados por respingos de água que caem das bancadas, contaminar o sistema. Para evitar esse problema, o solo deve ser cimentado ou coberto com brita para desfavorecer a sobrevivência de patógenos (LOPES et al., 2005).

Uma vez detectada a presença de *Pythium*, o sistema hidropônico deverá passar por um rigoroso processo de desinfecção antes de se iniciar uma nova safra. Deve-se ter atenção também com a desinfecção da solução nutritiva, quando ela não é descartada. Segundo ZHANG & TU (2000), a desinfecção total da solução recirculante é extremamente difícil de ser feita. Os autores informam que propágulos de *Pythium*, por exemplo, especialmente oósporos, que provavelmente sobrevivem à radiação ultravioleta, multiplicam e acumulam-se na rizosfera das plantas de pepino cultivadas em hidroponia. Relatam ainda que esse tipo de tratamento da solução provoca um declínio na população de *Pythium*, porém não reduz os sintomas por ele causado. Com o passar do tempo a população do patógeno se restabelece no sistema e a comunidade

bacteriana que não prejudica o desenvolvimento da planta sofre declínio. Esse declínio da microbiota favorece então a colonização e o restabelecimento do patógeno na superfície da raiz.

Dessa forma, uma alternativa para controlar essa enfermidade é o controle biológico.

#### **2.4 Controle biológico e promoção de crescimento de plantas**

O uso de microrganismos que beneficiam o desenvolvimento de determinada cultura seja pela promoção de crescimento seja pelo controle biológico é conhecido há muito tempo. Em breve histórico ROMEIRO (2007) cita que há séculos agricultores utilizavam técnicas de inoculação de microrganismos em sementes, mesmo sendo ainda de forma intuitiva. O autor destaca também trabalhos realizados no Oriente, ainda na década de 1960, por chineses que utilizavam sementes tratadas com rizobactérias. No país vizinho, a antiga União Soviética, a utilização de bactérias benéficas nas raízes de plantas também era prática comum. Mas devido ao regime político daquele país, pouco se sabia sobre os trabalhos que vinham sendo desenvolvidos naquela época, segundo FREITAS (2007). No Brasil, o controle biológico teve início na década de 1940, porém a utilização de bactérias no biocontrole é mais recente (MARIANO et al., 2004).

O controle biológico surge como uma alternativa na busca de produtos mais saudáveis, isentos de agrotóxicos que prejudicam animais e o ambiente, além de se enquadrar na agricultura orgânica e sustentável. Muitos trabalhos são realizados utilizando agentes biológicos que interferem nos processos vitais de fitopatógenos. Entre esses agentes destacam-se microrganismos, como *Bacillus* spp. (CARISSE et al., 2003), *Pseudomonas* spp. (JAYARAJ et al., 2007), *Trichoderma* spp. (BAPTISTA, 2007), *Streptomyces* spp. (SOUSA et al., 2008).

Produtos comerciais formulados à base de microrganismos são uma realidade tanto no mercado nacional como internacional. No Brasil, existem produtos formulados à base de fungos e rizobactérias, como os das espécies *Trichoderma* e *Bacillus*, respectivamente, recomendados para o controle de patógenos, em diversas culturas (ECCB, 2009; QUALIFERTIL, 2009). No exterior, nos Estados Unidos, por exemplo, são comercializados produtos biológicos formulados à base de bactérias promotoras de crescimento. MARIANO et al. (2004) apresentam uma lista desses produtos registrados nos EUA.



Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), em especial as pertencentes ao grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, também são muito estudadas, mas levam uma desvantagem em relação a *Bacillus*, segundo HAAS & DÉFAGO (2005), devido ao fato de sua viabilidade comercial ser menor. Nesse caso, um produto formulado à base de *Bacillus* possui um tempo de prateleira maior quando comparado a *Pseudomonas*. A vantagem está relacionada ao fato de as primeiras desenvolverem uma estrutura de resistência, denominada endósporo, produzida em condições adversas, que permite à bactéria resistir a essas condições (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Uma vez que as condições se modificarem, a favor do microrganismo, ele segue normalmente seu ciclo de reprodução, possibilitando manifestar suas características benéficas à planta hospedeira.

Estudos são realizados com o intuito de avaliar a forma correta de formulação, armazenamento e aplicação de produtos à base de microrganismos. Por exemplo, ALVES et al. (2001) avaliaram a viabilidade de um isolado de *Bacillus sphaericus* em dois tipos de formulação (suspensão concentrada de esporos e cristais da bactéria) e submetido a diferentes condições de ambientes e de temperatura elevada, no período de armazenamento, ao longo de 12 meses. Os autores observaram que a viabilidade da suspensão concentrada foi maior em comparação com os cristais da bactéria. Os esporos também não perderam suas características como agente de biocontrole quando armazenados em temperatura elevada. MÜLLER et al. (2008) utilizaram as técnicas de peletização, biofilme e suspensão bacteriana para aplicação do antagonista *Serratia plumutica* no controle de *Verticillium* spp. em sementes de oleaginosa, de estabilidade das células quando armazenadas e de viabilidade do produto. Os autores verificaram que a aplicação da suspensão do antagonista foi a técnica que se mostrou mais estável e eficiente quando armazenada a 20°C, quando comparada às outras técnicas de formulação.

O mecanismo de controle do patógeno pelo agente nem sempre é elucidado e são diversas as formas de atuação. Entre elas estão a antibiose (por produção de enzimas líticas, toxinas ou ácido cianídrico), competição (seja por nichos ecológicos ou nutrientes), hiperparasitismo, predação, hipovirulência, produção de sideróforos e indução de resistência (MELO & AZEVEDO, 1998; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ROMEIRO, 2007; CARDOSO FILHO & MINHONI, 2007).

Uma característica positiva do controle biológico é que um único antagonista pode exercer mais de um mecanismo de atuação sobre o patógeno e também beneficiar

diferentes culturas. Entretanto, um antagonista pode apresentar resultados satisfatórios num determinado estágio de desenvolvimento da planta, mas em outro não demonstrar nenhum efeito benéfico (GRAVEL et al. 2005; PERELLÓ et al. 2009); ou então um grupo de microrganismo pode ser favorecido na rizosfera de uma determinada cultura e em outra não. PERELLÓ et al. (2009) avaliaram o controle biológico de *Septoria tritici* em trigo, por isolados de *Trichoderma* spp. em condições de campo e também avaliaram a eficiência de duas formulações (suspensão de esporos e sementes peletizadas) à base desse microrganismo. Os autores verificaram que não houve diferença entre as formulações testadas. Porém, apontaram que um dos principais problemas que podem afetar as características desejáveis de um produto comercial biológico são as condições de microclima, época de aplicação, características do solo e até mesmo a perda da capacidade de antagonismo durante as etapas de multiplicação em laboratório, de acordo com PATRÍCIO et al. (2007). Em outro trabalho, COELHO (2006) avaliou a diferença fenotípica de diferentes bactérias em diferentes rizosferas e verificou que bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* desenvolvem-se em maior número na rizosfera de alface, quando comparada às rizosferas de rúcula e salsa. A autora concluiu ainda que o HCN produzido por esse gênero de bactérias é influenciado pelo tipo de planta.

Talvez aqui esteja um dos maiores problemas relatados em trabalhos, inclusive com rizobactérias promotoras de crescimento, segundo FREITAS (2007): a variabilidade dos resultados obtidos. Em uma revisão feita pela autora, é apontada a inconstância de alguns resultados apresentados em alguns trabalhos e destaca-se a importância do controle e diminuição da variabilidade, pelo menos em parte, do local onde a RPCP será inoculada, de modo que a característica benéfica do microrganismo seja mantida no habitat. Seguindo essa mesma linha de raciocínio, MARIANO et al. (2004) enfatizam que estudos com bactérias promotoras de crescimento com potencial no biocontrole devem integrar-se em um sistema de manejo sustentável e mostram que os problemas identificados por essas pesquisas, aos poucos, vão sendo solucionados.

Diversos estudos confirmam que o controle biológico é uma boa alternativa na busca por alimentos saudáveis e que, em alguns casos, ocorre até ganho na produtividade, já que alguns microrganismos promovem crescimento das plantas. CARISSE et al. (2003) isolaram diversos microrganismos com potencial no controle de *Pythium ultimum* em pepino e realizaram testes *in vitro* e *in vivo*. Os autores verificaram que os isolados de *Zygorhynchus moelleri* e *Penicillium thomii* foram os mais eficientes

nos testes *in vitro*, além de terem diminuído a incidência de “damping-off”, causada pelo patógeno. Segundo BROWN (1987), um dos modos de atuação do antagonista *Z. moelleri* é a produção de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4-glucanases que degradam glucana, composto da parede celular tanto de ascomicetos como de oomicetos, caracterizando dessa forma o controle biológico por meio da antibiose.

A modificação genética do antagonista de interesse pode ser também uma das formas de controle biológico de fitopatógenos. De acordo com WALSH et al. (2001), pode-se alterar a característica genética de espécies de *Pseudomonas* spp., com o intuito de aumentar a produção de metabólitos antifúngicos, por exemplo, alterando-se a fase logarítmica de crescimento do microrganismo, uma vez que esses metabólitos são produzidos nessa fase.

Segundo KLOEPPER et al. (1989), citados por GOMES et al. (2003), o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) favorece a produção agrícola pelo aumento de rendimento.

No Brasil, existem diversos trabalhos que mostram o efeito benéfico de rizobactérias e outros microrganismos que, além de atuarem como promotores de crescimento de plantas, também exercem antagonismo a diversos patógenos. Em estudo realizado por GOMES et al. (2003), foi observado que mudas de alface tratadas com isolados de *Bacillus* spp. obtiveram maior massa quando comparadas às não tratadas. Também com alface, FREITAS et al. (2003), obtiveram maior desenvolvimento de plantas tratadas com isolados fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. BETTIOL et al. (1997) realizaram aplicações de um produto na forma de pó-molhável e metabólitos concentrados produzidos por *Bacillus subtilis* na parte aérea plantas de pepino e abóbora para controlar lesões provocadas por oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). Os autores verificaram que a pulverização de produtos formulados à base do antagonista resultou em maior massa de matéria fresca das plantas, quando comparadas à testemunha pulverizada apenas com água. Além disso, observaram que as folhas foram pulverizadas com os concentrados produzidos à base do antagonista, não apresentaram lesões causadas pelo patógeno.

O benefício de rizobactérias sobre o crescimento de plantas também pode ser observado em outras culturas além de hortaliças. FREITAS & VILDOSO (2004), avaliaram a eficiência de rizobactérias quanto à promoção de crescimento de diferentes porta-enxertos de plantas cítricas e verificaram que alguns isolados promoveram o crescimento das raízes das plantas cítricas. AMORIM & MELO (2002) também

avaliaram em plantas de citros o antagonismo de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. a *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*. Os resultados obtidos *in vitro* mostraram um possível antagonismo tanto pela produção de sideróforos como pela produção de substâncias tóxicas e nos testes *in vivo* os isolados reduziram a infecção causada pelos dois isolados do patógeno.

Outro mecanismo de controle biológico é a resistência sistêmica induzida (RSI), em que um microrganismo aumenta a capacidade de defesa da planta contra um ou mais patógenos. A resistência da planta é induzida pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Esses agentes podem ativar um conjunto de respostas após o reconhecimento de um patógeno ou da aplicação exógena do indutor, possibilitando-lhe assim responder mais rapidamente à infecção, promovendo uma resposta de resistência (CARVALHO & BACH, 2004). Além de conferir resistência à planta, o agente indutor pode, promover seu crescimento, como observado em estudos feitos por SILVA et al. (2008a). Esses autores realizaram testes em casa de vegetação e *in vitro* com bactérias endofíticas no controle e inibição de *Pseudomonas syringae*, agente da pinta bacteriana de tomateiro. Eles verificaram que mais de 50% dos isolados que controlaram a pinta bacteriana, em casa de vegetação, foram da espécie *Bacillus pumilus* e essa espécie junto ao *Bacillus amyloliquefaciens* foram as mais eficazes no controle do patógeno *in vitro*. Os autores também verificaram que vários isolados não só controlaram o patógeno, mas também promoveram o crescimento das plantas. Outra espécie de *Bacillus*, *B. cereus*, promoveu controle de *Pseudomonas syringae* em plantas de tomate, por indução de resistência (HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Esse mecanismo de ação foi proposto devido às características das interações observadas pelos autores, como ausência de antibiose, sistemicidade da proteção e aumento significativo dos níveis de peroxidase nas plantas. SILVA et al. (2008b) também observaram aumento significativo de peroxidase em plantas de café e atribuíram esse efeito aos isolados das endófitas *Brevibacillus choshinensis* e *Cedecea davisae* inoculados. A identificação dessa enzima em folhas das plantas, que não foram tratadas com os antagonistas, permitiu que os autores concluíssem que a forma de controle do patógeno também exercida foi a de indução de resistência.

A expressão indução de resistência pode ser utilizada para designar uma proteção local isto é, apenas nos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também pode indicar uma resistência sistêmica que se manifesta à

distância do local de aplicação do indutor (BONALDO et al., 2005; MORAES, 1992; HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997, citados por KUHN et al. 2006).

A produção de sideróforos por rizobactérias está associada ao mecanismo de competição. Em condições limitantes de ferro disponível, rizobactérias produzem uma variedade de agentes quelantes de ferro, denominados sideróforos, que são capazes de solubilizar esse metal. Os sideróforos diminuem o desenvolvimento de patógenos na rizosfera devido à ação desses quelantes na disponibilidade de ferro, os quais, conseqüentemente, agem como promissores agentes de controle biológico (JOSHI et al., 2008). Muitos sideróforos produzidos por fungos e bactérias foram identificados e denominados como pseudobactina, rizobactina, aerobactina, entre outros (ZAGO et al., 2000). O ferro caracteriza-se por ser abundante em diversos ambientes, porém sua disponibilidade é baixa, particularmente em solos ácidos como os brasileiros (ABREU et al., 2007). Trata-se de um elemento de importância não apenas para as plantas e organismos superiores, mas também para os microrganismos, por ser essencial na redução de oxigênio para a síntese de ATP (ROMEIRO, 2007). CARDOSO FILHO & MINHONI (2007) ressaltam que nem todos os tipos de sideróforos produzidos por microrganismos estão relacionados ao controle biológico de fitopatógenos. Mas chamam a atenção para a competição existente entre *Pythium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Fusarium* spp. por ferro, com destaque para o sideróforo pioverdina envolvido nessa competição. MATTHIJS et al. (2007) realizaram testes *in vitro* para avaliar o efeito do sideróforos tiolobactina, quinolobactina e pioverdina no crescimento miceliano de *Pythium debaryanum*. Os autores observaram que nem todos os sideróforos produzidos estão envolvidos no controle de fitopatógenos, mas concluíram que o sideróforo tiolobactina pode não apenas complexar ferro, mas também, exercer atividade antimicrobiana contra *P. debaryanum*.

A utilização do controle biológico em hidroponia tem a vantagem de a atuação de agentes de biocontrole ser diretamente na zona de infecção do fitopatógeno, pois ambos os microrganismos competem pelos exsudatos presentes na zona radicular (CORREIA, 2006).

Existem trabalhos que comprovam a eficiência de isolados de diversos microrganismos no controle de doenças causadas por espécies de *Pythium* em cultivo hidropônico. Dentre esses microrganismos estão *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas fluorescens*. Em estudos realizados por ZHENG et al. (2000), essas espécies possivelmente induziram resistência a *Pythium aphanidermatum* em plantas de

pepino hidropônico. Em plantas de alface hidropônica, UTKHEDE et al. (2000) verificaram que o produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, além de aumentar a massa de matéria fresca da parte aérea das plantas e raízes, também reduziu a doença. CHATTERTON et al. (2004) inocularam um isolado de *P. chlororaphis* (Tx-1) a diferentes intervalos de tempo antes de inocular zoósporos do patógeno em plantas de pimentão hidropônico. Os autores verificaram que, por meio de antibiose, provavelmente por produção de fenazinas, o isolado interferiu no desenvolvimento de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* nas raízes dessas plantas. Segundo ROMEIRO (2007), as fenazinas são substâncias estudadas por exercerem antagonismo a vários microrganismos. Presume-se que essas substâncias possuem ação antifúngica ao se associarem à membrana da hifa, causando toxicidade às células. A produção de substâncias antimicrobianas, como as fenazinas, é apenas um dos mecanismos de antagonismo que microrganismos podem acionar para sobreviver em comunidades microbianas complexas.

Estudos realizados por ZHOU & PAULITZ (1993) mostraram que isolados de *Pseudomonas* e zoósporos de *Pythium* competem por carbono e nitrogênio na raiz de plantas de pepino hidropônico e que há diminuição da germinação de zoósporos quando as plantas são tratadas com a rizobactéria. Nesse caso, ocorreu interação direta do agente de controle biológico e o patógeno. Os autores ainda relatam que, além da competição por exsudatos radiculares, o antagonista reduziu o nível de cátions responsáveis pela alta germinação em solução nutritiva e também houve competição por espaço entre os zoósporos e o antagonista. Em raízes de pepino cultivado em hidroponia, KHAN et al. (2003) mostraram que *Pseudomonas chlororaphis* reduziu consideravelmente o escurecimento de raízes causado por *Pythium aphanidermatum*, quando o antagonista foi adicionado ao sistema hidropônico antes da introdução do patógeno.

No Brasil, estudos realizados por CORRÊA (2006) mostraram que *Bacillus subtilis* promoveu o crescimento de plantas de alface em hidroponia e o antagonista *Clonostachys rosea* controlou a podridão de raízes causada por *P. aphanidermatum*. Em experimentos *in vitro*, BERNARDES (2006) selecionou isolados de *Pseudomonas* spp. que aumentaram o crescimento de radículas de plântulas de alface. Os mesmos isolados bacterianos foram testados em experimentos *in vivo*, com plantas de pepino com raízes divididas, para verificação de possível indução de resistência, em cultivo hidropônico. Nesse trabalho, a autora observou que alguns isolados aumentaram o crescimento de

raízes infectadas com *P. aphanidermatum*, onde não houve contato direto entre o antagonista e o patógeno.

BAPTISTA (2007) realizou testes para verificar a eficiência de um produto comercial à base do fungo *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium dissotocum*, *in vitro* e *in vivo* em plantas de alface hidropônica. O autor obteve resultados satisfatórios, pois o produto biológico comercial reduziu a podridão radicular nos dois testes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos

O isolado de *Pythium* sp. utilizado em todos os experimentos foi obtido de canteiros de hortaliças intensamente cultivados e faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico, em Campinas.

Os isolados de rizobactérias testados em todos os experimentos pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do Instituto Agrônomo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Origem dos isolados de *Pseudomonas* utilizados nos testes *in vitro* e *in vivo*.

Isolado	Origem	Isolado	Origem
MP1	Rúcula hidropônica	LP22	Chicória
MP2	*	LP28	Alface
MP3	*	LP31	Rúcula
MP4	*	LP44	Alface
MP5	*	LP47	Rúcula
MP6	*	Ps21A	Algodoeiro
MP7	*	Ps 51A	Tomateiro
MP8	*	Ps 60B	Citros
LP10	Alface	Ps89	Couve
LP12	Alface	Ps143C	Rúcula
LP13	Alface	Ps852C	Alface
LP15	Rúcula	Ps864C	Alface
LP16	Rúcula	Ps866B	Alface
LP17	Alface	Ps871B	Alface

\*Origem desconhecida.

#### 3.2 Promoção de crescimento e controle biológico *in vitro*

Os isolados de *Pseudomonas* testados neste experimento, mantidos em meio B de King et al. (1954), sob óleo mineral, foram transferidos para tubos de ensaio com

meio de B de King inclinado e mantidos a 28°C por 24 horas. Decorrido o tempo, transferiram-se duas alçadas de cada colônia bacteriana para tubos contendo 5 mL de solução de Mg.SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 0,01 mol L<sup>-1</sup>, e em seguida agitados em agitador mecânico.

As sementes de alface (cv. Verônica) foram imersas nas suspensões dos isolados por 10 minutos e em seguida incubadas, por 24 horas, em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada, para germinação. As sementes pré-germinadas tratadas, separadamente, com os isolados de *Pseudomonas* foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura ágar-água. Nos testes de controle biológico, adicionou-se, no centro de cada placa, um disco de meio de cultura BDA com micélio de *Pythium* sp. As placas foram mantidas a 28°C ± 2°C com fotoperíodo de 12 horas, por um período de cinco a sete dias. O mesmo método foi adotado para os experimentos de promoção de crescimento, mas com ausência do patógeno. Decorrido o tempo de incubação foram avaliados os comprimentos do hipocótilo e da radícula. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições e os resultados analisados pelo teste de Scott Knott a 5%.

Testaram-se os isolados LP10, LP12, LP13, LP16, LP44, LP47, Ps21A, Ps89, Ps143C, Ps852C, Ps864C, Ps866B, Ps871B MP1, MP2, MP3, MP4, MP5, MP6, MP7 e MP8 em 4 experimentos distintos.

Realizou-se uma estimativa para o número de células bacterianas contidas na suspensão pela contagem do número de unidades formadoras de colônias – ufc (Tabela 2). Essa estimativa foi feita por diluição em série, onde alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram dispersas em placas de Petri com meio de cultura B de King. A contagem das colônias foi feita após incubação a 28°C por 24 horas.



**Tabela 2.** Concentração das suspensões bacterianas, em unidades formadoras de colônias (ufcs mL<sup>-1</sup>), utilizadas para inoculação das plantas nos experimentos em sistema hidropônico (*in vitro*).

Isolado	N° de unidades formadoras de colônias (ufcs mL <sup>-1</sup> )			
	Experimento I	Experimento II	Experimento III	Experimento IV
Ps 21A	9,2 x 10 <sup>8</sup>			
Ps 89	9,7 x 10 <sup>8</sup>			
Ps 143C	1,3 x 10 <sup>9</sup>			
Ps 852C	7,8 x 10 <sup>8</sup>			
MP 1	8,7 x 10 <sup>8</sup>			
LP 10		5,9 x 10 <sup>9</sup>		
LP 12		1,9 x 10 <sup>9</sup>		
LP 13		1,1 x 10 <sup>9</sup>		
LP 16		1,4 x 10 <sup>9</sup>		
MP 2			9,3 x 10 <sup>8</sup>	
MP 3			1,0 x 10 <sup>9</sup>	
MP 4			1,5 x 10 <sup>9</sup>	
MP 5			7,0 x 10 <sup>8</sup>	
MP 6			1,0 x 10 <sup>9</sup>	
MP 7			1,7 x 10 <sup>9</sup>	
MP 8			1,0 x 10 <sup>9</sup>	
LP 44				1,2 x 10 <sup>9</sup>
LP 47				8,8 x 10 <sup>8</sup>
Ps 864C				9,1 x 10 <sup>8</sup>
Ps 866B				1,3 x 10 <sup>9</sup>
Ps 871B				9,7 x 10 <sup>8</sup>

### 3.3 Sistema hidropônico e obtenção de mudas de alface

O sistema hidropônico utilizado foi o de cultivo em pequenos recipientes (*Container Culture* – CC) plásticos com dimensões de 13,5 x 15cm, com capacidade para 2 litros de solução nutritiva e o arejamento da solução foi feito por um compressor.

Sementes peletizadas de alface crespa (cv. Verônica) foram semeadas em espumas fenólicas 2,0 x 2,0 x 2,0cm (Green-up - Atlanta) e quando atingiram o ponto de desenvolvimento ideal foram transplantadas para recipientes com solução nutritiva (Tabela 3). Esse método de obtenção de mudas foi utilizado apenas para os experimentos onde as raízes das plantas não foram divididas. A água utilizada em todos os experimentos foi destilada e esterilizada e a solução nutritiva formulada de acordo

com a recomendação de FURLANI et al. (1999). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em 1,5 mS.

**Tabela 3.** Fonte de nutrientes e as concentrações usadas na formulação da solução nutritiva.

Fonte	Concentração (g/L)
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	4,33
KNO <sub>3</sub>	8,29
MKP	2,07
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,33
FeEDTA	4
Sequelene (micronutrientes)	0,012
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,27

### 3.3.1 Obtenção de suspensão bacteriana de *Pseudomonas* spp.

Para obtenção de suspensão bacteriana de *Pseudomonas* spp., os isolados foram transferidos para tubos de ensaio com meio B de King inclinado e mantidos nele por 24 horas a 28°C. Em seguida, duas alçadas de cada colônia foram transferidas, separadamente, para tubos que continham 50 mL de meio B de King líquido, permanecendo na incubadora a 28°C por um período de 24 horas. Logo após, os meios de cultura com o crescimento bacteriano foram centrifugados por 15 minutos a 3000 x g. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 0,01 mol.L<sup>-1</sup> para ressuspender as células bacterianas. Adicionaram-se 10 mL da suspensão bacteriana nos recipientes, sete dias após a transferência das mudas (com 15-20 dias de idade aproximadamente) para o sistema hidropônico. Realizou-se uma estimativa para o número de células bacterianas contidas na suspensão (Tabela 4), igual à descrita no item 3.2.

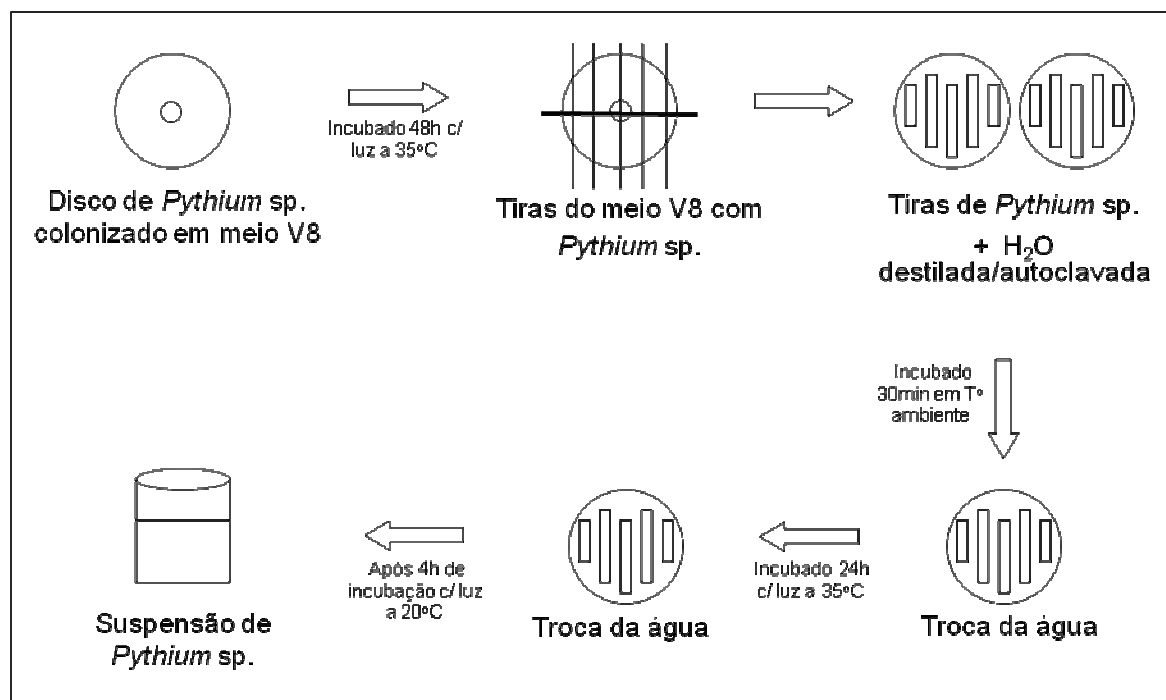
**Tabela 4.** Concentração das suspensões bacterianas, em unidades formadoras de colônias (ufcs mL<sup>-1</sup>), utilizadas para inoculação das plantas nos experimentos em sistema hidropônico (*in vivo*).

Isolado	N° de unidades formadoras de colônias (ufcs mL <sup>-1</sup> )			
	Experimento I	Experimento II	Experimento III	Experimento IV
Ps 21A	1,9 x 10 <sup>8</sup>	2,6 x 10 <sup>8</sup>		
Ps 89	1,7 x 10 <sup>8</sup>			
Ps 143C	3,9 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>8</sup>		
Ps 852C	4,2 x 10 <sup>8</sup>	3,9 x 10 <sup>8</sup>		
MP 1	2,8 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>		
Ps 864C		3,7 x 10 <sup>8</sup>		
Ps 866B		7,2 x 10 <sup>8</sup>		
Ps 871B		7,6 x 10 <sup>7</sup>		
LP 10		4,4 x 10 <sup>8</sup>		
LP 12		3,9 x 10 <sup>8</sup>		
LP 13		4,1 x 10 <sup>8</sup>		
LP 15		2,4 x 10 <sup>8</sup>		
LP 16		6,6 x 10 <sup>8</sup>		
MP 2			7,2 x 10 <sup>8</sup>	
MP 3			1,2 x 10 <sup>9</sup>	
MP 4			7,0 x 10 <sup>8</sup>	
MP 5			1,5 x 10 <sup>9</sup>	
MP 6			8,0 x 10 <sup>8</sup>	
MP 7			6,0 x 10 <sup>8</sup>	
MP 8			6,3 x 10 <sup>8</sup>	
LP 17				2,5 x 10 <sup>9</sup>
LP 22				2,9 x 10 <sup>9</sup>
LP 25				3,0 x 10 <sup>9</sup>
LP 28				2,9 x 10 <sup>9</sup>
LP 44				3,4 x 10 <sup>9</sup>
LP 47				2,5 x 10 <sup>9</sup>

### 3.3.2 Obtenção de zoósporos de *Pythium* sp.

Para obtenção de zoósporos de *Pythium* sp. foi utilizada a técnica descrita por RAHIMIAN & BANIHASHEMI (1979). O patógeno foi transferido para placas de Petri com meio de cultura V8 e posteriormente incubado a 35° C por um período de 48 horas. Decorrido esse período, com o uso de um estilete esterilizado foram feitas tiras do meio de cultura com colônia do patógeno e metade delas foram transferidas para outras placas. Adicionou-se água destilada e esterilizada suficiente para cobrir o meio de

cultura contendo o micélio. Essas placas são mantidas por trinta minutos em temperatura ambiente; depois desse período a água foi trocada por outra também destilada e esterilizada. As placas com o meio de cultura e o patógeno foram novamente mantidas a 35° C por mais 24 horas. Após esse período, a água foi trocada novamente e as placas foram colocadas a 20° C por quatro horas (Figura 1). Decorrido esse período, a suspensão de zoósporos e micélio de *Pythium* sp. estava pronta para ser inoculada no sistema hidropônico.



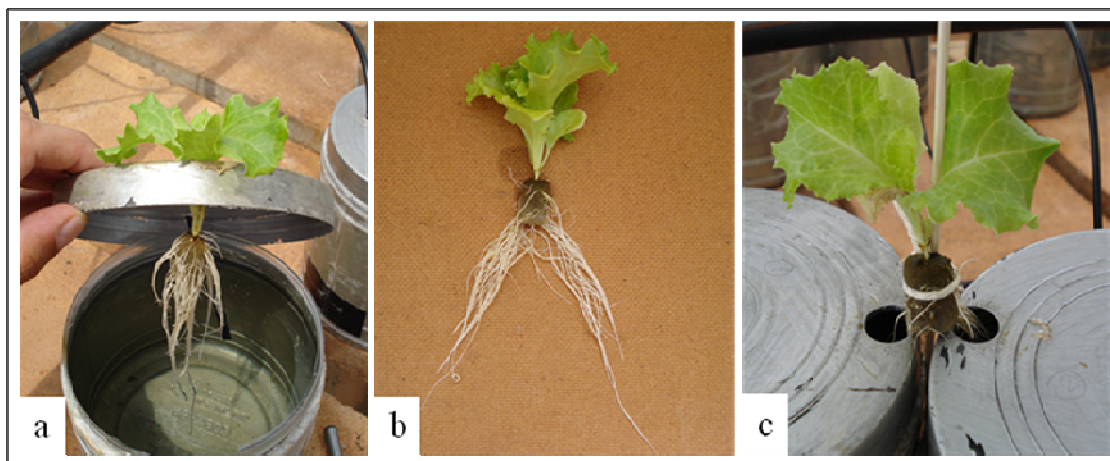
**Figura 1.** Produção de zoósporos de *Pythium* sp.

### 3.3.3 Verificação de indução de resistência

A raiz principal das plântulas de alface com dez dias de idade foi podada, para que houvesse maior desenvolvimento das raízes secundárias. Aos quinze dias de idade as plântulas foram transferidas para recipientes que continham solução nutritiva. As raízes das plantas foram divididas em diferentes épocas (25, 30, 35 e 40 dias após semeadura) para saber em qual delas as raízes divididas melhor se adaptariam ao sistema hidropônico adotado. Após alguns testes verificou-se que as plantas cujas raízes foram podadas trinta dias após a semeadura foram as que mais se adequaram à divisão e ao sistema instalado (Figura 2).

A divisão das raízes, nesse caso, é necessária para que não haja contato direto entre antagonista e patógeno. A inoculação prévia do antagonista em parte das raízes

das plantas aumenta as chances de serem desencadeados alguns mecanismos de defesa na planta, em relação ao patógeno, de modo que quando o patógeno for inoculado não prejudique a planta hospedeira.



**Figura 2.** a) Planta de alface com trinta dias de idade em recipiente com solução nutritiva; b) raiz dividida; c) planta no sistema hidropônico; metade da raiz recebeu suspensão de zoósporos (recipiente da esquerda) e outra metade, suspensão bacteriana (recipiente da direita).

A verificação de indução de resistência sistêmica foi realizada em um experimento em casa de vegetação, pelo método de raízes divididas. Nesse experimento, desenvolvido entre 30 de novembro de 2007 e 7 de fevereiro de 2008, utilizaram-se 5 isolados de *Pseudomonas* (MP1, Ps 21A, Ps143C, Ps852C).

### 3.3.4 Interação de *Pseudomonas* spp. e *Pythium* sp.

Realizaram-se três experimentos para avaliar o potencial de *Pseudomonas* no controle biológico e promoção de crescimento das plantas, sem divisão das raízes. No primeiro experimento, realizado no período de 4 de março a 29 de abril, utilizaram-se 11 isolados de *Pseudomonas* spp (MP1, Ps21A, Ps143C, Ps864C, Ps866B, Ps871B, LP10, LP12, LP13, LP15 E LP16); no segundo, 7 isolados (MP2, MP3, MP4, MP5, MP6, MP7 e MP8), no período de 03 de maio a 28 de junho, e no terceiro, 7 isolados (LP17, LP22, LP25, LP28, LP31, LP44, LP47), no período de 28 de outubro a 4 de dezembro de 2008. Os métodos de obtenção das plântulas, dos isolados do patógeno e das rizobactérias já foram descritos em itens anteriores.

### 3.3.5 Isolamento a partir de raízes e plaqueamento da solução nutritiva

Para verificação da presença do patógeno no sistema hidropônico realizou-se coleta das raízes das plantas de alface, no momento da colheita, tratadas com a suspensão de zoósporos de *Pythium*. O material coletado foi levado ao laboratório, onde foi lavado com água destilada e esterilizada e posteriormente colocado, separadamente, em placas de Petri com meios de cultura BDA e V8.

Outra forma utilizada para verificação do patógeno no sistema foi o plaqueamento da solução nutritiva. Para tanto, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em meio de cultura semelhante ao utilizado para isolamento das raízes.

### 3.3.6 Avaliação

O delineamento adotado para todos os experimentos *in vivo* foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. A avaliação do efeito dos tratamentos sobre as plantas foi feita cerca de vinte e cinco dias depois da aplicação da suspensão do patógeno, por meio de notas atribuídas ao escurecimento das raízes (Tabela 5), baseada na escala de notas usada por KHAN et al. (2003), com algumas adaptações. A parte aérea das plantas foi separada das raízes, na altura do caule, e ambas permaneceram em estufa a 60°C até obtenção de massa de matéria seca constante. Todas as variáveis foram analisadas pelo teste Scott-Knott com 5% de probabilidade.

**Tabela 5.** Notas referentes à porcentagem de raízes escurecidas das plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico.

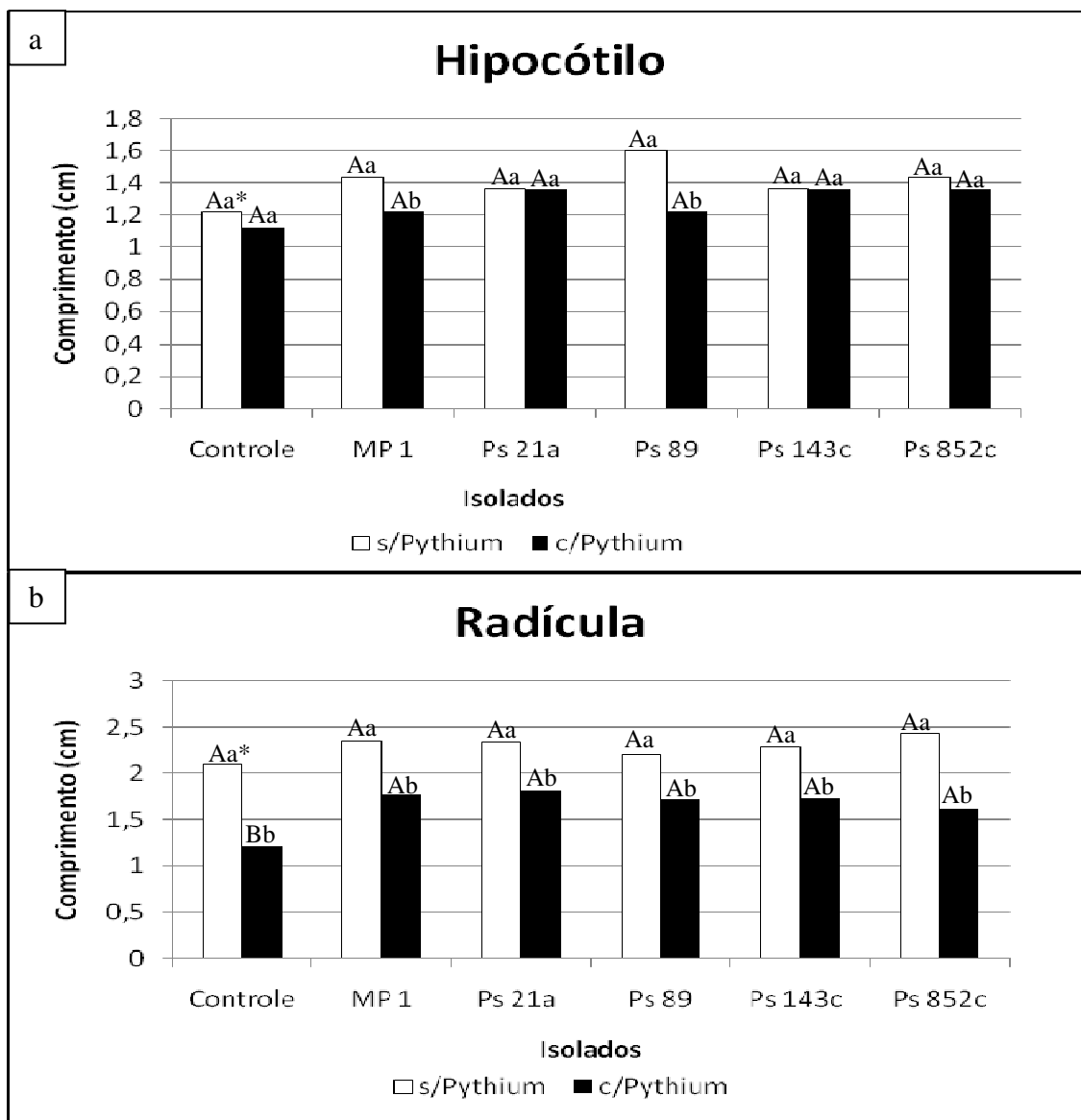
Nota	Porcentagem de raízes escuras
1	0 - 20%
2	21 - 40%
3	41 - 60%
4	61 - 80%
5	81 - 100%

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Testes *in vitro* – promoção de crescimento e controle biológico

Os resultados ilustrados na figura 3a mostram que os isolados testados não exerceram qualquer influência positiva sobre o comprimento do hipocótilo. Observou-se também que o tratamento controle, apenas com *Pythium*, não causou sintomas prejudiciais no comprimento do hipocótilo das plântulas. Contudo, o efeito de dois isolados (MP1 e Ps89) chama a atenção, pois quando as sementes foram tratadas com as respectivas suspensões dos antagonistas observou-se significativa diminuição do comprimento do hipocótilo, quando inoculados em conjunto com *Pythium* (Figura 3a).

O efeito dos microrganismos sobre o hipocótilo foi diferente do verificado nas radículas das plântulas. Para essa variável, observou-se manifestação da característica patogênica de *Pythium*, por ter reduzido o crescimento das radículas em todos os isolados testados (Figura 3b); além disso, não houve promoção de crescimento de radículas pela inoculação dos isolados bacterianos na ausência do patógeno. A presença do patógeno diminuiu o comprimento das radículas tanto em relação ao controle absoluto (sem rizobactéria e sem *Pythium*) quanto na presença dos isolados bacterianos. Mas, nos tratamentos com inoculação conjunta dos isolados bacterianos e do patógeno para avaliar a eficiência de controle biológico, observou-se que todos os isolados diferiram significativamente do controle com o patógeno, pois as plântulas apresentaram maior comprimento da radícula.



**Figura 3.** Comprimento (cm) do hipocótilo (a) e radícula (b) de plântulas de alfaca tratadas com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e na ausência de *Pythium* sp. Médias de 5 repetições.

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. Letras maiúsculas comparam, dentro de cada tratamento com o patógeno, o efeito da inoculação das rizobactérias. Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno (*Pythium* sp.). Coeficiente de variação (CV%) do hipocótilo, 13,0; da radícula, 13,6.

Em outro experimento realizado, não se observou, efeito de promoção de crescimento do hipocótilo pelas rizobactérias utilizadas (Figura 4a), na ausência do patógeno. Porém, diferentemente dos resultados observados na figura 3a, neste o patógeno interferiu no desenvolvimento do hipocótilo, por ter diminuído seu comprimento, mesmo nos tratamentos com os isolados das rizobactérias.



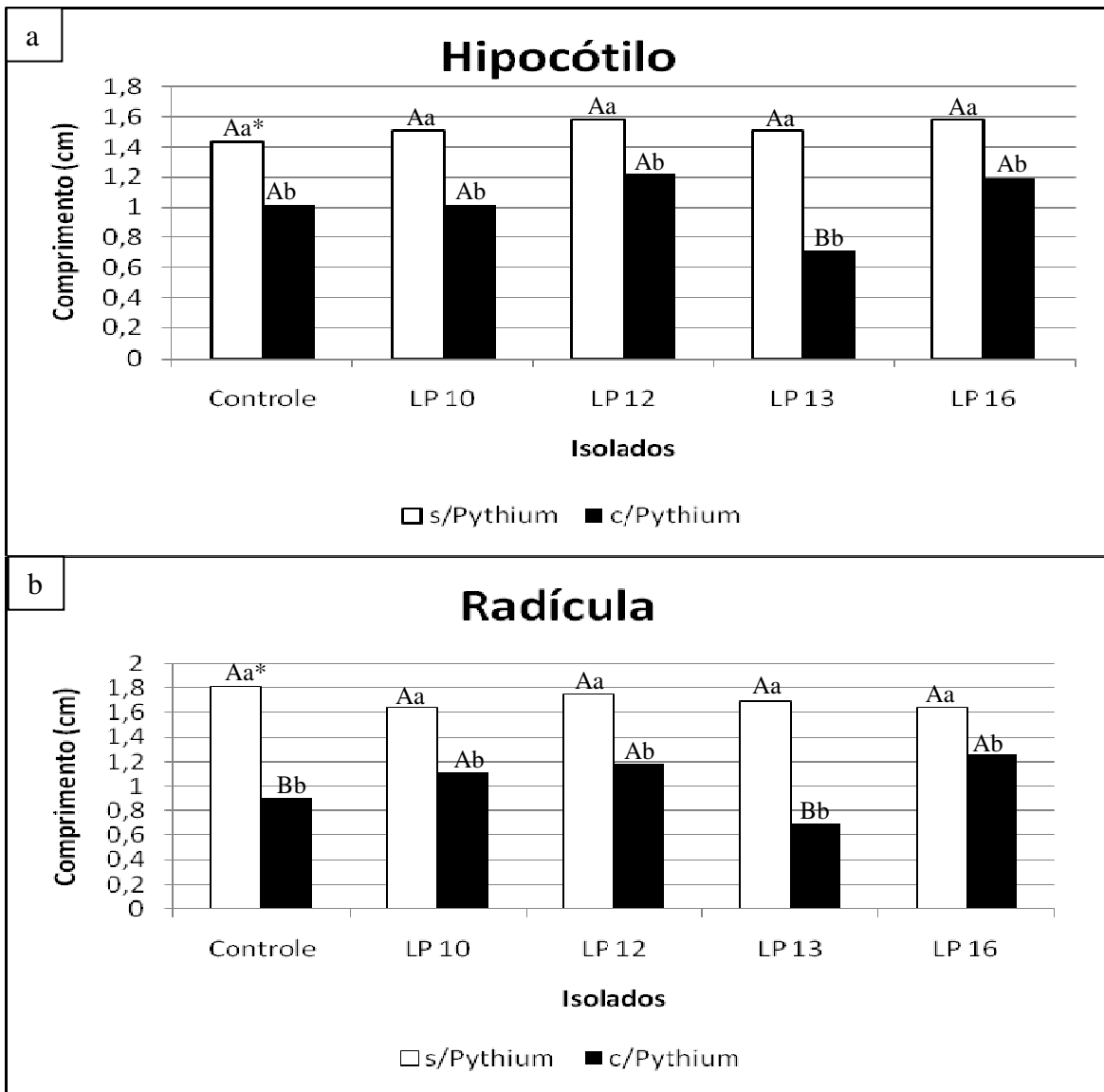
Os resultados apresentados mostram que nenhum dos isolados promoveu o crescimento da radícula (Figura 4b), a exemplo do que aconteceu com o hipocótilo. A inoculação conjunta do patógeno e do isolado LP13 causou significativa redução no comprimento do hipocótilo e da radícula quando comparado inclusive ao tratamento controle com *Pythium*. No entanto, os isolados LP10, LP12 e LP 16 promoveram maior crescimento da radícula das plântulas, na presença do patógeno, caracterizando o controle da doença.

Os isolados testados não promoveram crescimento do hipocótilo na ausência do patógeno (Figura 5a). Destaca-se o efeito dos isolados MP2 e MP6 que controlaram a manifestação do patógeno em comparação com o tratamento controle, apenas com *Pythium*. Além disso, as plântulas originadas de sementes tratadas com o isolado MP6 não diferiram significativamente no tamanho dos hipocótilos das plântulas com e sem o patógeno, o que caracteriza o controle biológico da doença.

Nenhum isolado exerceu efeito benéfico sobre o desenvolvimento das plântulas, como promoção de crescimento das radículas (Figura 5b), assim como controle dos sintomas causados pelo patógeno. A presença do patógeno causou significativa diminuição no comprimento das radículas no controle e na presença de todos os isolados bacterianos.

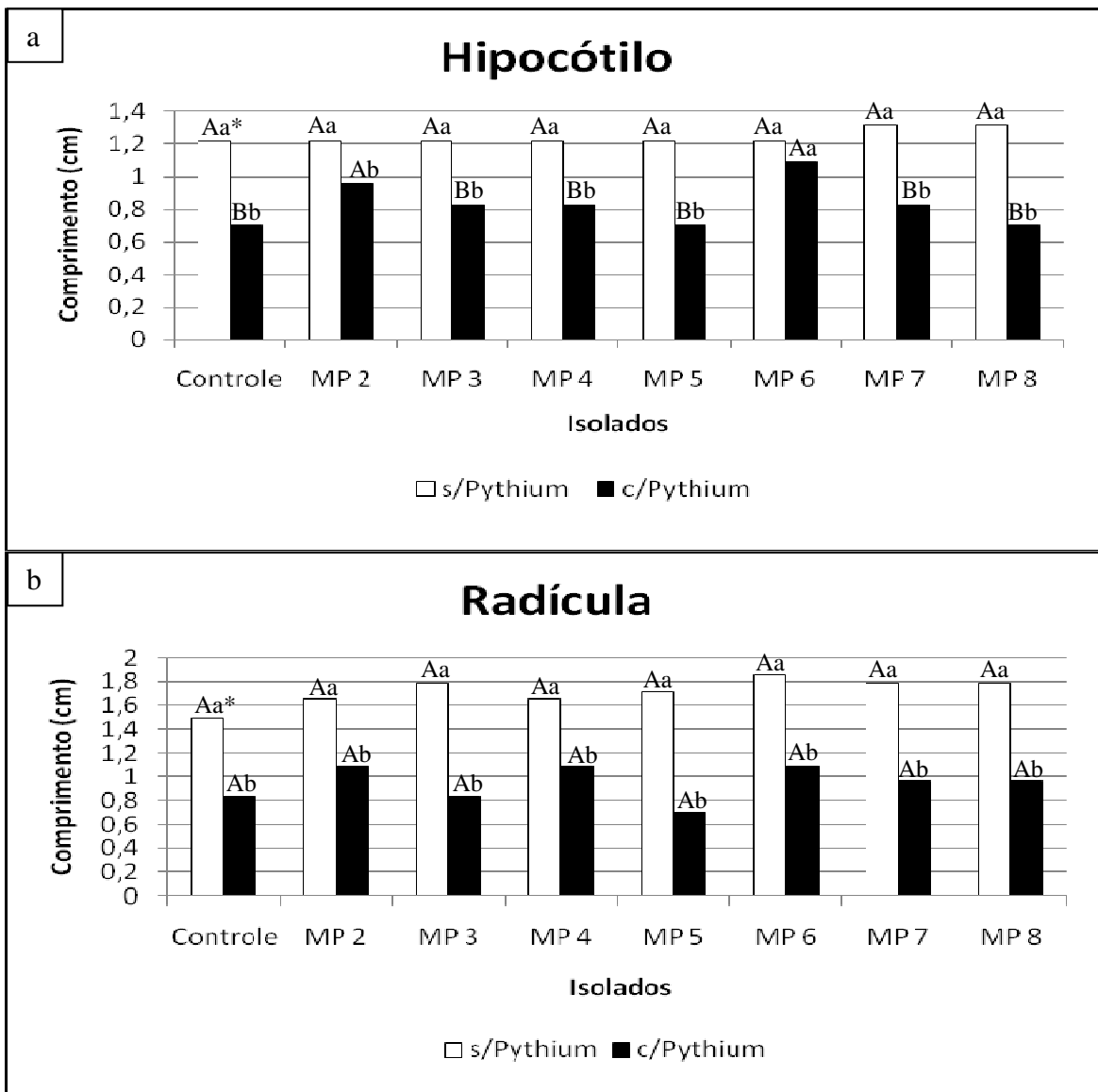
Os isolados testados não promoveram crescimento do hipocótilo das plântulas; também não controlaram o efeito negativo do patógeno no desenvolvimento do hipocótilo nos tratamentos de inoculação conjunta em relação ao controle somente com *Pythium* (Figura 6a).

As plântulas cujas sementes foram tratadas com suspensão dos isolados LP 44, LP47, Ps864C e Ps871B apresentaram maior comprimento de radícula, na ausência do patógeno (Figura 6b). No entanto, o benefício dos isolados ocorreu apenas para a promoção de crescimento, pois não se observou controle do patógeno. A presença do patógeno causou significativa e drástica redução no comprimento das radículas.



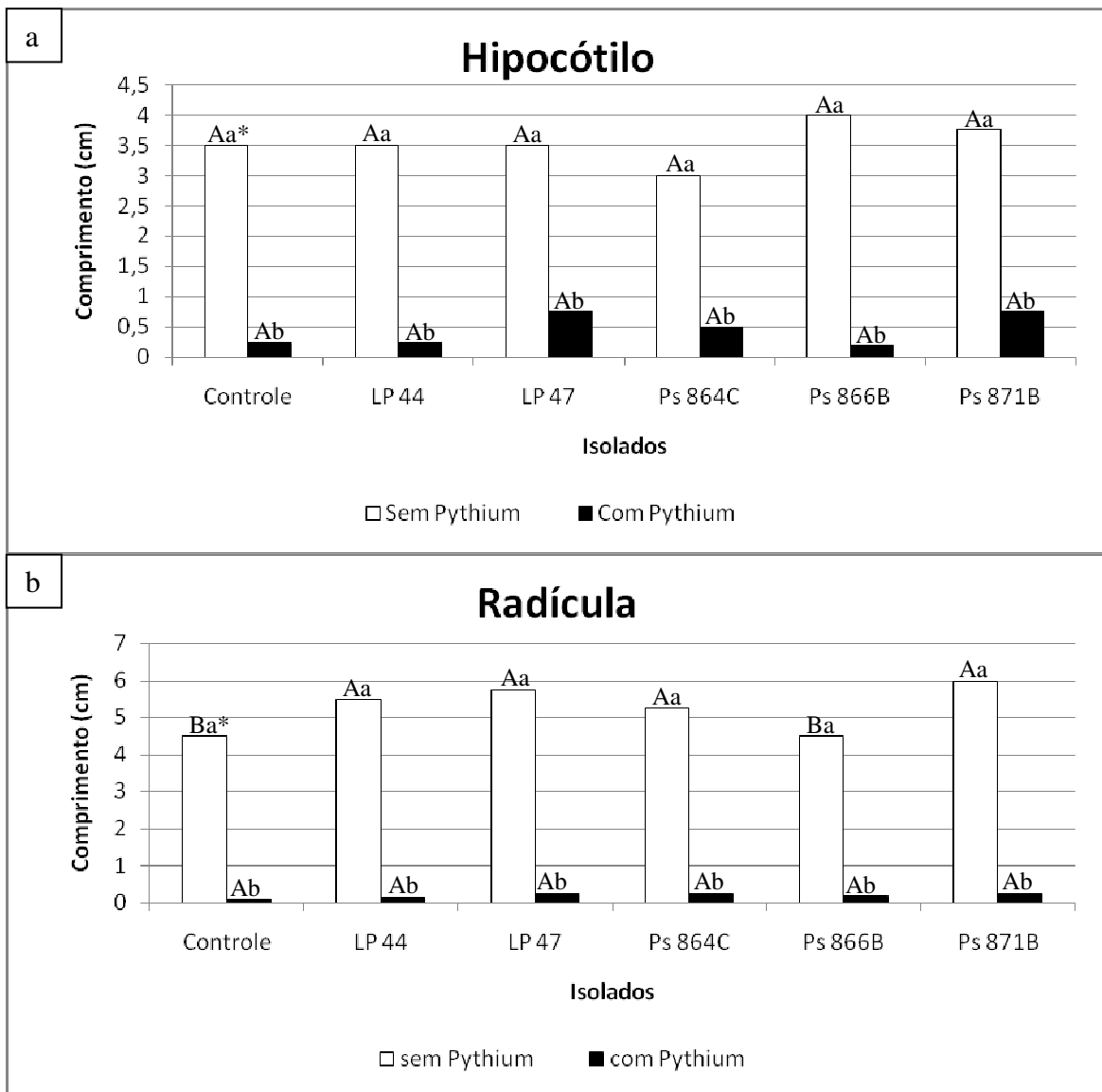
**Figura 4.** Comprimento (cm) do hipocótilo (a) e radícula (b) de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e ausência de *Pythium* sp. Médias de 5 repetições.

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. Letras maiúsculas comparam, dentro de cada tratamento com o patógeno, o efeito da inoculação das rizobactérias. Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno (*Pythium* sp.). Coeficiente de variação (CV%) do hipocótilo, 14,5; da radícula, 15,6.



**Figura 5.** Comprimento (cm) do hipocótilo (a) e radícula (b) de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e ausência de *Pythium* sp. Médias de 5 repetições.

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. Letras maiúsculas comparam, dentro de cada tratamento com o patógeno, o efeito da inoculação das rizobactérias. Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno (*Pythium* sp.). Coeficiente de variação (CV%) do hipocótilo, 14,3; da radícula, 15,95.



**Figura 6.** Comprimento (cm) do hipocótilo (a) e radícula (b) de plântulas de alface tratadas com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas *in vitro* na presença e ausência de *Pythium* sp. Médias de 5 repetições.

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. Letras maiúsculas comparam, dentro de cada tratamento com o patógeno, o efeito da inoculação das rizobactérias. Letras minúsculas comparam, dentro de cada tratamento com bactéria, o efeito da inoculação do patógeno (*Pythium* sp.). Coeficiente de variação (CV%) do hipocótilo, 28,8; da radícula, 20,3.

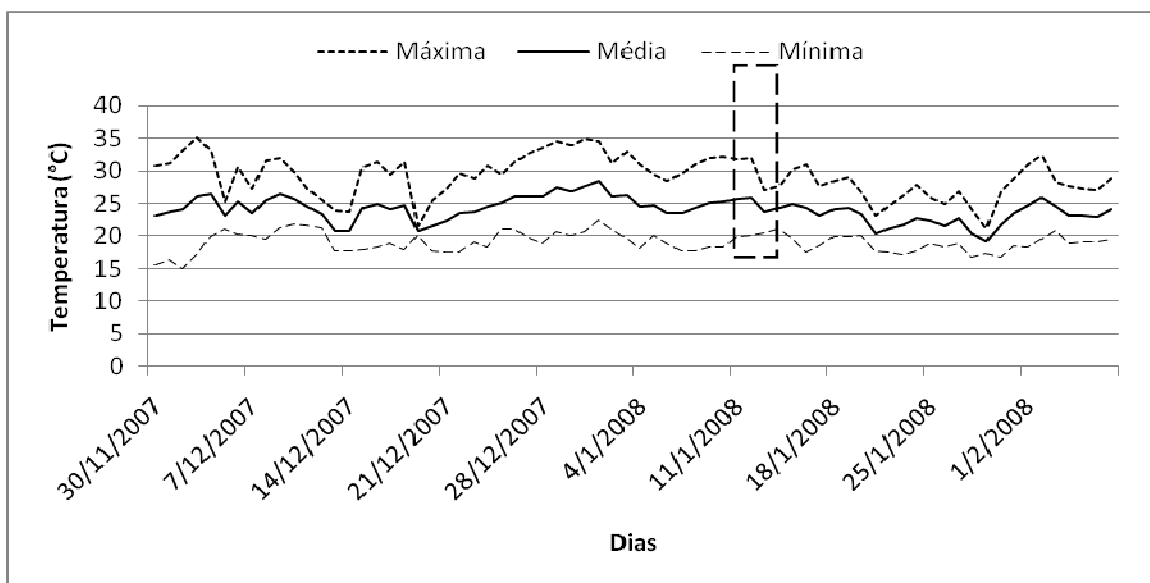
## 4.2 Testes *in vivo*

### 4.2.1 Indução de resistência e efeito da interação de rizobactérias e *Pythium* spp.

As temperaturas máximas, médias e mínimas do local onde foi desenvolvido o experimento foram monitoradas diariamente. As suspensões dos antagonistas e de

zoósporos do patógeno foram inoculadas, respectivamente, nos dias 7 e 14 de janeiro de 2008 (Figura 7).

No momento da colheita das plantas, coletaram-se também amostras da solução nutritiva e de raízes para verificação do patógeno no sistema, cuja presença, no entanto, não foi detectada. O escurecimento das raízes é um sintoma visível característico de plantas infectadas pelo patógeno, que não foi verificado nessas plantas.



**Figura 7.** Valores das temperaturas máximas, médias e mínimas registradas durante o período de desenvolvimento do primeiro experimento (*in vivo*) em casa de vegetação. Área dentro do retângulo tracejado corresponde, aproximadamente, ao dia de inoculação do patógeno.

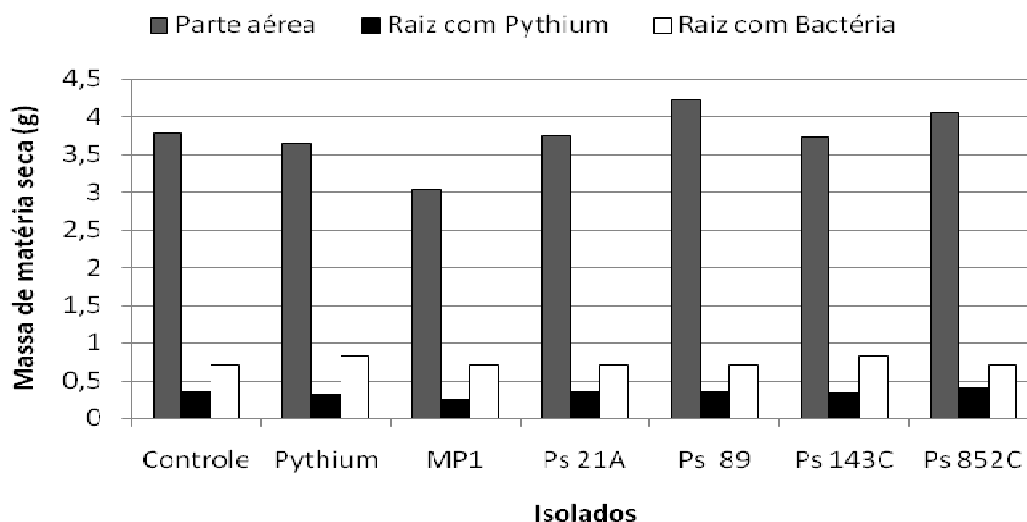
As notas atribuídas ao escurecimento das raízes (Tabela 6) mostram que não houve diferença significativa entre os isolados inoculados e os tratamentos controle e *Pythium*.

**Tabela 6.** Notas atribuídas ao escurecimento das raízes de alface causada por *Pythium* sp. Escala de 1 (sem escurecimento) a 5 (raízes muito escurecidas). Médias de 4 repetições.

Tratamentos	Notas	
	<i>c/ Pseudomonas</i> spp.	<i>c/Pythium</i> sp.
Controle	1,00 a	1,00 a
<i>Pythium</i>	1,00 a	1,37 a
Ps 21a	1,00 a	1,50 a
Ps 89	1,00 a	1,00 a
Ps 143C	1,25 a	1,25 a
Ps 852C	1,50 a	1,25 a
MP 1	1,00 a	1,00 a

\*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

A inoculação de zoósporos do patógeno e a inoculação conjunta de zoósporos e isolados de *Pseudomonas* não influenciaram na massa de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas de alface (Figura 8).

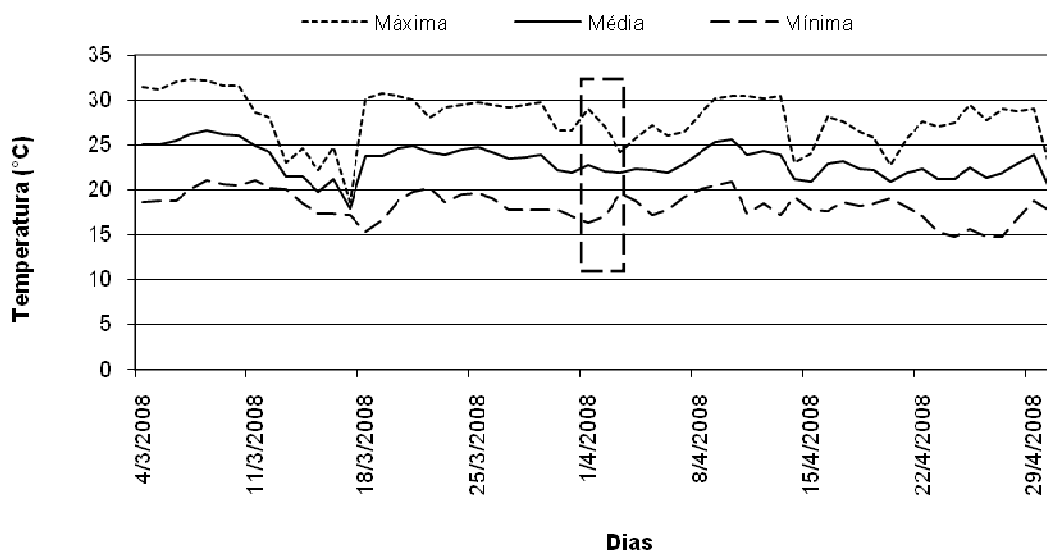


**Figura 8.** Massa de matéria seca (g) da parte aérea e raiz de plantas de alface tratadas com suspensão de zoósporos de *Pythium* sp. e com suspensão de isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas em sistema hidropônico. Médias de 4 repetições. Coeficiente de variação (CV%) da parte aérea, 31,0, raiz com *Pythium* 28,9 e raiz com bactéria, 18,5.

Diferentemente do experimento anterior, nos próximos as raízes não foram divididas, tendo havido, portanto, contato direto entre antagonista e patógeno. O objetivo dos experimentos foi avaliar *in vivo* o efeito da interação do patógeno e de

isolados de *Pseudomonas* spp. no controle do patógeno e na promoção de crescimento da planta.

No primeiro experimento, as inoculações dos antagonistas testados e da suspensão de zoósporos do patógeno foram realizadas, respectivamente, nos dias 28 de março e 4 de abril de 2008. As temperaturas foram monitoradas ao longo de todo o experimento (Figura 9).



**Figura 9.** Valores das temperaturas máximas, médias e mínimas registradas durante o período de desenvolvimento do segundo experimento (*in vivo*) em casa de vegetação. Área dentro do retângulo tracejado corresponde, aproximadamente, ao dia de inoculação do patógeno.

Amostras da solução nutritiva e raízes das plantas foram coletadas, no momento de colheita das plantas, para verificação do patógeno no sistema, cuja presença foi detectada.

Os resultados obtidos mostram que sintomas como escurecimento das raízes (Tabela 7) não foram observados tanto nas plantas tratadas com os isolados das rizobactérias e suspensão de zoósporos de *Pythium*, como nas plantas apenas tratadas com suspensão de zoósporos do patógeno.

**Tabela 7.** Notas atribuídas ao escurecimento das raízes de alface causada por *Pythium* sp. Escala de 1 (sem escurecimento) a 5 (raízes muito escurecidas). Médias de 4 repetições.

Tratamento	Notas
Controle	1,00 a*
<i>Pythium</i>	1,50 a
MP 1+ <i>Pythium</i>	1,75 a
Ps 21A + <i>Pythium</i>	1,50 a
Ps 143C + <i>Pythium</i>	2,25 a
LP 10 + <i>Pythium</i>	1,00 a
LP 12 + <i>Pythium</i>	1,50 a
LP 13 + <i>Pythium</i>	1,25 a
LP 15 + <i>Pythium</i>	1,50 a
LP 16 + <i>Pythium</i>	1,50 a
Ps 864C + <i>Pythium</i>	2,00 a
Ps 866B + <i>Pythium</i>	1,50 a
Ps 871B + <i>Pythium</i>	1,75 a

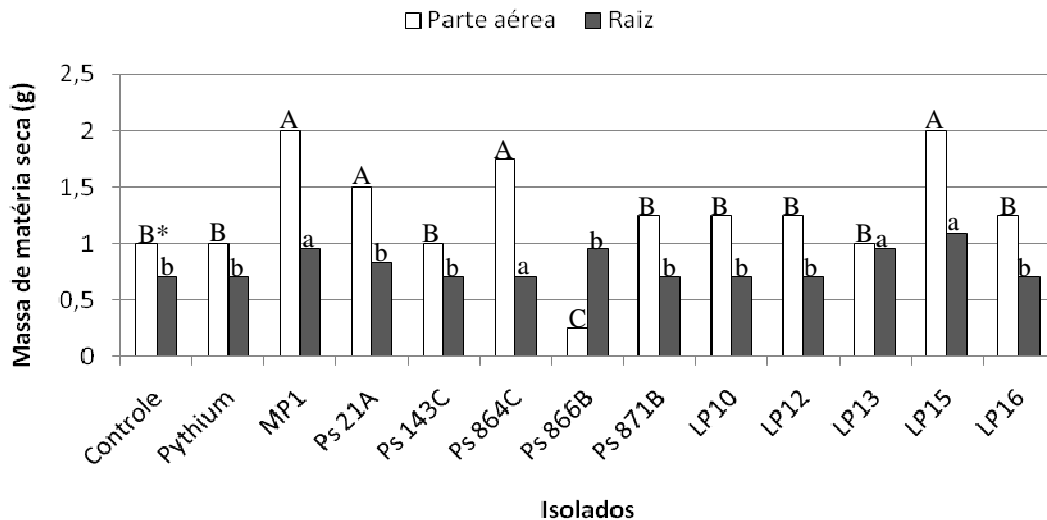
\*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Porém, ao avaliar a massa de matéria seca das raízes e parte aérea das plantas, notaram-se diferenças significativas das variáveis sem (controle) e com o patógeno em comparação com as tratadas com suspensão de zoósporos do patógeno e dos isolados de rizobactérias (Figura 10).

As partes aéreas das plantas previamente tratadas com os isolados MP1, Ps21A, Ps864C e LP15 apresentaram maior massa de matéria seca quando comparadas ao tratamento controle sem *Pythium* (Figura 10), demonstrando promoção de crescimento devido à inoculação dos isolados. Ao avaliar a massa de matéria seca das raízes, observou-se que os isolados LP13, LP15 e MP1 promoveram o aumento, ou seja, crescimento de raiz.

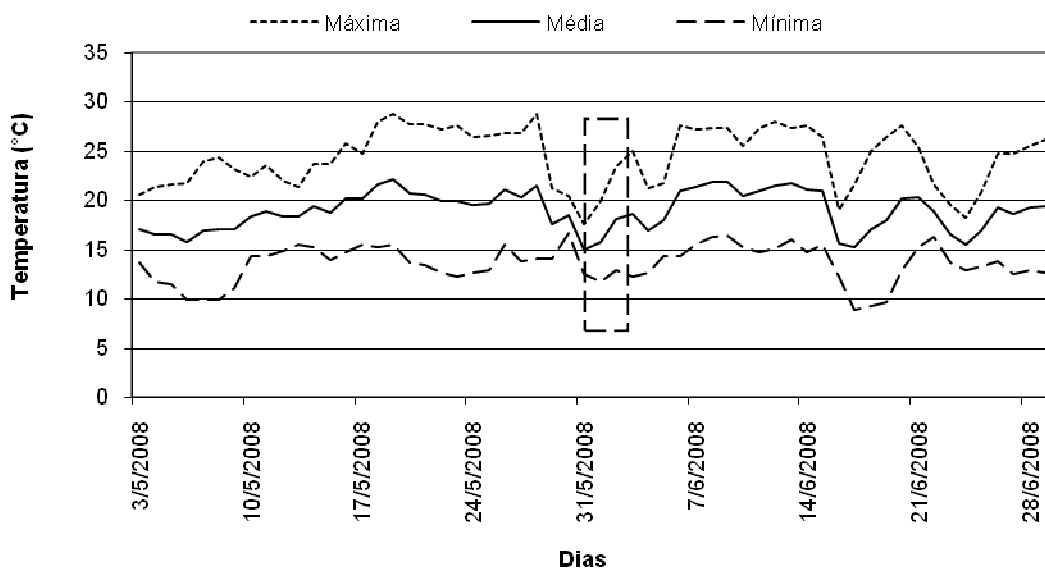
A inoculação dos isolados Ps21A, MP1, Ps864C e LP15 juntamente com o patógeno promoveu maior produção de massa de matéria seca da parte aérea que o tratamento somente com o patógeno, mostrando efeito satisfatório na promoção de crescimento dessa variável.





**Figura 10.** Massa de matéria seca (g) da parte aérea e raiz de plantas de alface tratadas com suspensão de zoósporos de *Pythium* sp. e com suspensão de isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas em sistema hidropônico. Médias de 4 repetições. Coeficiente de variação (CV%) da parte aérea, 34,5 e raiz 21,8. \*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott. Letras maiúsculas comparam valores para parte aérea e minúsculas para raiz.

Em um terceiro experimento, a inoculação das suspensões de outros isolados de rizobactérias e suspensão de zoósporos do patógeno foram, respectivamente, nos dias 26 de maio e 2 de junho de 2008 e a temperatura do local, monitorada ao longo de todo o experimento (Figura 11).



**Figura 11.** Temperaturas máximas, médias e mínimas registradas durante o período de desenvolvimento do segundo experimento (*in vivo*) em casa de vegetação.

Por meio do plaqueamento e isolamento das raízes das plantas, não se detectou a presença do patógeno no sistema hidropônico. Características como escurecimento das raízes não foram observadas, como mostra a tabela 8.

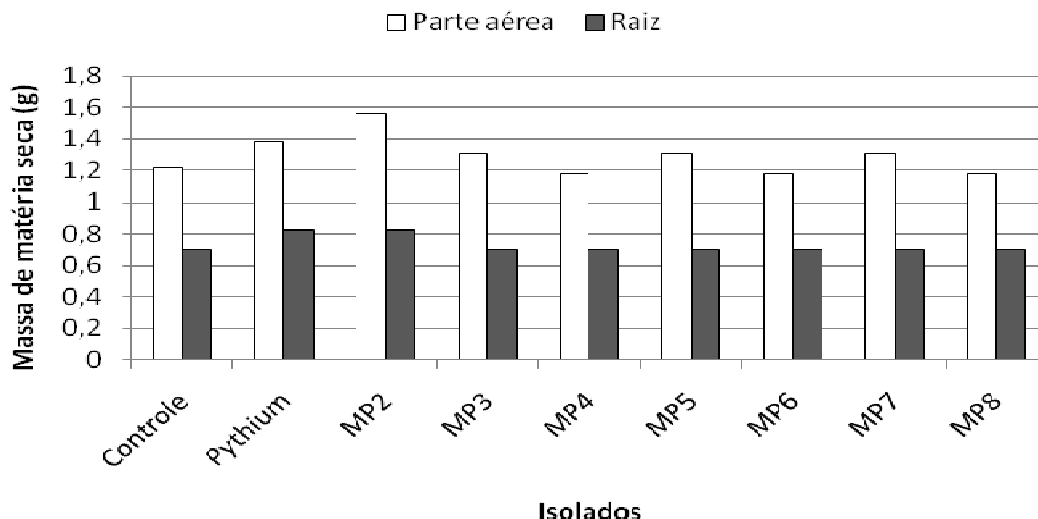
**Tabela 8.** Notas atribuídas ao escurecimento das raízes de alface causada por *Pythium* spp. Escala de 1 (sem escurecimento) a 5 (raízes muito escurecidas). Médias de 4 repetições.

Tratamento	Notas
Controle	1,00 a*
<i>Pythium</i>	2,00 a
MP 2 + <i>Pythium</i>	2,00 a
MP 3 + <i>Pythium</i>	1,25 a
MP 4 + <i>Pythium</i>	2,00 a
MP 5 + <i>Pythium</i>	2,00 a
MP 6 + <i>Pythium</i>	2,25 a
MP 7 + <i>Pythium</i>	2,25 a
MP 8 + <i>Pythium</i>	2,00 a

\*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Também não foi detectado efeito do patógeno sobre as variáveis: massa de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas, quando comparadas ao controle que não recebeu inoculação de suspensão de zoósporos de *Pythium* (Figura 12).

Não houve promoção de crescimento, nem controle biológico pelos isolados inoculados, em nenhuma das variáveis analisadas. Na verdade, como não houve diminuição do crescimento das plantas tratadas com suspensão de zoósporos do patógeno, não poderia haver efeito deletério nas plantas que indicasse o controle biológico.

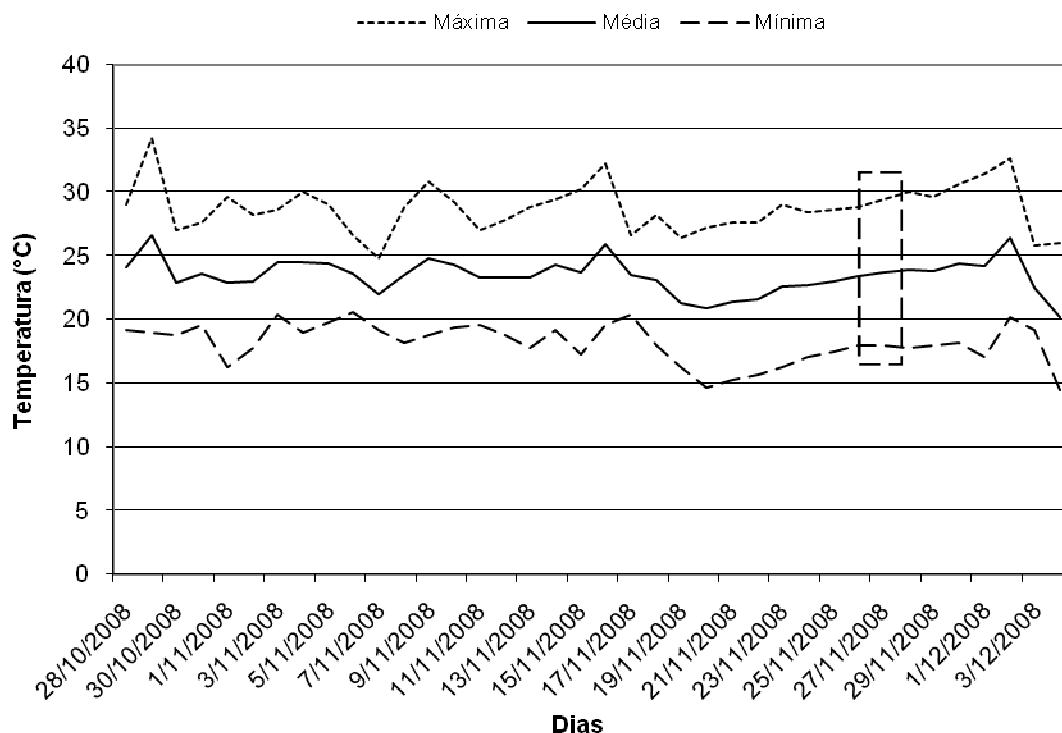


**Figura 12.** Massa de matéria seca (g) da parte aérea e raiz de plantas de alface tratadas sem suspensão de zoósporos de *Pythium* sp. e com suspensão de isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas em sistema hidropônico. Médias de 4 repetições. Coeficiente de variação (CV%) da parte aérea, 20,8 e raiz 16,5.

No último experimento, a inoculação das suspensões dos isolados de rizobactérias e suspensão de zoósporos do patógeno foram, respectivamente, nos dias 21 e 27 de novembro de 2008, e a temperatura do local também foi monitorada ao longo de todo o experimento (Figura 13).

No momento da colheita das plantas, coletaram-se também amostras da solução nutritiva e de raízes para verificação do patógeno no sistema, e foi constatada sua presença.

Ao avaliar as notas atribuídas ao escurecimento das raízes, verifica-se que houve sintomas visuais típicos de podridão radicular causada por *Pythium*, devido ao maior escurecimento das raízes das plantas do controle com *Pythium*. As raízes tratadas com os isolados bacterianos LP17, LP 44 e LP 47 desenvolveram menos sintomas de escurecimento, quando comparadas às raízes tratadas com suspensão de zoósporos do patógeno.



**Figura 13.** Temperaturas máximas, médias e mínimas registradas durante o período de desenvolvimento do terceiro experimento (*in vivo*) em casa de vegetação.

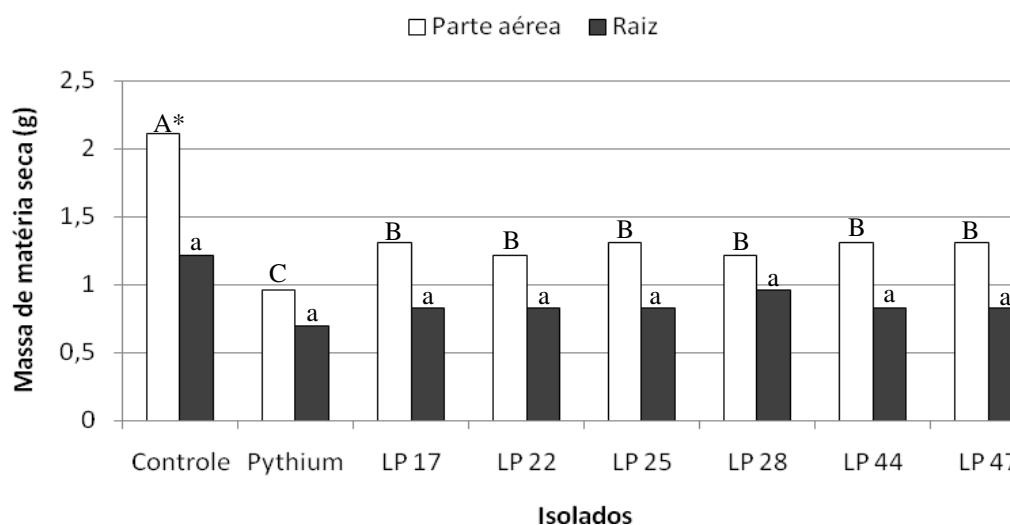
**Tabela 9.** Notas atribuídas ao escurecimento das raízes de alface causada por *Pythium* sp. Escala de 1 (sem escurecimento) a 5 (raízes muito escurecidas). Médias de 4 repetições.

Tratamento	Notas
Controle	1,00 a*
<i>Pythium</i>	4,75 c
LP 17 + <i>Pythium</i>	3,50 b
LP 22 + <i>Pythium</i>	4,25 c
LP 25 + <i>Pythium</i>	4,50 c
LP 28 + <i>Pythium</i>	4,25 c
LP 44 + <i>Pythium</i>	4,00 b
LP 47 + <i>Pythium</i>	3,75 b

\*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Nenhum dos isolados inoculados promoveu crescimento da planta tanto da parte aérea como das raízes (Figura 14). No entanto, as plantas infectadas pelo patógeno desenvolveram maior massa da matéria seca quando tratadas com os isolados

bacterianos, demonstrando que esses controlaram a manifestação do patógeno nessa variável.



**Figura 14.** Massa de matéria seca (g) da parte aérea e raiz de plantas de alface tratadas sem suspensão de zoósporos de *Pythium* sp. e com suspensão de isolados de *Pseudomonas* spp., cultivadas em sistema hidropônico. Médias de 4 repetições. Coeficiente de variação (CV%) da parte aérea 12,4 e da raiz, 26,0.

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott. Letras maiúsculas comparam valores para parte aérea e minúsculas para raiz.

## 5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho, no Brasil, de controle biológico de *Pythium* spp. por rizobactérias, em plantas de alface cultivadas em hidroponia.

Nos experimentos *in vitro* realizados, observou-se de modo geral que a inoculação conjunta do patógeno e antagonista resultou em efeito negativo ao desenvolvimento das plântulas de alface, no tamanho do hipocótilo. No entanto, alguns isolados resultaram, na presença do patógeno, em diminuição da incidência da doença. Por exemplo, os isolados Ps21A, Ps143C e MP6 estimularam o crescimento da parte aérea, indicando um controle da manifestação da doença.

Quanto ao comprimento da radícula, a inoculação do patógeno interferiu negativamente no desenvolvimento das plântulas, pois ocasionou sintomas característicos de infecção por *Pythium* spp. como escurecimento e subdesenvolvimento das raízes, nos quatro experimentos. Isso era realmente de se esperar, uma vez que microrganismos do gênero *Pythium* são patógenos de raízes. Entretanto, os isolados MP1, Ps 21A, PS89, Ps143C, Ps852c, LP10, LP12 e LP16 (Figura 3b e 4b) controlaram

esse efeito deletério causado pelo patógeno. Muitos trabalhos mostram que alguns isolados possuem potencial para controle biológico em um determinado estágio de desenvolvimento da cultura, porém não em um estágio posterior. Isso também foi observado por GRAVEL et al. (2005), que realizaram seleção de isolados de *Pseudomonas* spp. com potencial para controle de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium ultimum*, na germinação de sementes e no tombamento de plântulas de tomate. Dos 237 isolados testados, 40 apresentaram potencial para controle dos patógenos, *in vitro* e as espécies *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. putida*, *P. syringae* e *P. viridiflava* reduziram significativamente o tombamento de plântulas causado pelos patógenos. Os autores alertam para o fato de que um microrganismo pode evitar a infecção do patógeno em sementes, porém não exercer nenhum benefício ao hipocótilo da plântula. Esse efeito pode ter ocorrido no presente trabalho. No presente trabalho os isolados LP44, LP47 e Ps 871B, não exerceram qualquer efeito benéfico ao hipocótilo, porém proveram crescimento das radículas das plântulas (Figura 6b).

BERNARDES (2006) realizou testes de promoção de crescimento e controle biológico de *Pythium* em plântulas de alface, *in vitro*, com alguns dos isolados testados neste trabalho. A autora verificou promoção de crescimento do hipocótilo e radículas das plântulas que receberam suspensão do isolado Ps143C. Esse resultado é um tanto diferente do que foi observado no presente trabalho, já que esse mesmo isolado promoveu apenas o controle biológico nas radículas. Outro resultado diferente obtido pela autora foi em relação ao isolado Ps852C, que, naquele trabalho, prejudicou o desenvolvimento do hipocótilo, inclusive quando comparado ao controle com o patógeno. No entanto, seu efeito isolado na radícula foi diferente, uma vez que promoveu seu crescimento. No presente trabalho esse isolado ~~não~~ promoveu maior crescimento da radícula, na presença do patógeno. O isolado Ps21A promoveu o crescimento e controlou o efeito negativo do patógeno no hipocótilo nos testes realizados BERNARDES (2006); a autora observou ainda que esse isolado é produtor de ácido hidrocianico (HCN), metabólito que apresenta propriedades inibitórias de patógenos e também promove o crescimento das plantas, aumentando o desenvolvimento de pelos radiculares (LUZ, 1996). Além disso, o isolado diferiu significativamente do controle com *Pythium*, o que caracterizou o controle biológico, em ambos os trabalhos.

Os testes *in vitro* realizados permitiram selecionar isolados com potencial no controle do patógeno ou promoção de crescimento de plântulas. Esse tipo de teste é

vantajoso, pois permite selecionar um grande número de isolados em um curto espaço de tempo (SOTTERO, 2003).

Os resultados do presente trabalho, *in vitro*, puderam ser comparados aos de BERNARDES (2006) por terem utilizado os mesmos isolados, planta hospedeira, além do que os experimentos foram mantidos praticamente sob as mesmas condições. A utilização de um mesmo isolado em diferentes experimentos, até em diferentes plantas hospedeiras e patógenos, aumenta as chances de se obter um isolado eficiente, com potencial para formulação, comercialização e aplicação em diversas culturas. Verificam-se, na literatura, outros trabalhos onde se testou um mesmo isolado em diferentes experimentos. A exemplo disso, CIPRIANO et al. (2005) testaram isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em plântulas de pepino, em sistemas hidropônicos. Os autores verificaram que dois dos isolados não controlaram o patógeno, inclusive ocasionaram morte das plântulas e os outros dois isolados controlaram a doença no sistema. Contudo, em outro trabalho *in vitro*, SOUSA et al. (2005) testaram o potencial de dois dos mesmos isolados – testados pelos autores citados anteriormente – no controle de *Pythium helicoides*, em plântulas de alface, em sistemas hidropônicos. Nesse trabalho os autores obtiveram resultado benéfico não apenas para o isolado com tal característica já comprovada anteriormente, mas também para o isolado que não controlou o patógeno em plântulas de pepino. BAPTISTA (2007) também realizou testes *in vitro* para verificar o controle biológico de *Pythium dissotocum* por um produto comercial a base do fungo *Trichoderma* spp. em plântulas de duas cultivares de alface (uma lisa e outra crespa). O autor testou diferentes concentrações (0,1; 0,2 e 0,3mL/L) do produto e verificou que todas essas inibiram o desenvolvimento do patógeno e reduziram parcialmente os níveis de doença, e concluiu também que o produto a base do fungo foi fundamental na promoção de crescimento das radículas.

Nos testes para verificação de indução de resistência, a não-ocorrência dos sintomas pode ser justificada por diversos fatores. Uma possível explicação para os resultados obtidos é a época de inoculação dos microrganismos. A doença se manifesta em plantas jovens, característica que também favorece a promoção de crescimento. Neste experimento, as suspensões bacterianas foram inoculadas quando as plantas estavam com 37 dias de idade, e a suspensão do patógeno, inoculada quando estavam com 44 dias de idade, e já não estariam suscetíveis ao patógeno. No caso, houve necessidade de esperar algum tempo para se fazer a inoculação, porque o sistema de

cultivo utilizado (Figura 2) exigiu plantas um pouco maiores, de modo a permitir a divisão das raízes e sua fixação entre os dois recipientes com solução nutritiva. Também é sabido que a temperatura é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento não somente das plantas, mas também dos microrganismos. No caso do gênero *Pythium*, uma espécie pode ser mais agressiva que outra, dependendo da estação do ano, de acordo com GOLD & STANGHELLINI (1985), que avaliaram o efeito da temperatura sobre as espécies *P. aphanidermatum* e *P. dissotocum* em plantas de espinafre cultivadas em sistema hidropônico. Essa constatação feita pelos autores pode explicar os resultados obtidos no presente trabalho, ao serem observadas as temperaturas registradas na época em que a suspensão de zoósporos do patógeno foi inoculada no sistema hidropônico: no primeiro, segundo e terceiro experimentos a média das temperaturas registradas foram respectivamente 24, 23 e 16°C (Figuras 7,16 e 20). No quarto experimento a média das temperaturas foi de 24°C; no entanto, nos dias posteriores à inoculação do patógeno, houve aumento (Figura 20), o que não aconteceu nos experimentos anteriores. Esses resultados mostram que a temperatura, principalmente na época de inoculação dos microrganismos, foi um fator que interferiu significativamente nos sintomas de escurecimento e podridão de raízes causados pelo patógeno. TEIXEIRA et al. (2006) avaliaram o efeito da temperatura na patogenicidade de *Pythium* spp. em alface hidropônica, e verificaram que o isolado *P. helicoides* foi mais agressivo quando submetido a 30°C do que a 21°C. Os autores concluíram nesse trabalho que fatores ambientais, em cultivo hidropônico, podem determinar a presença de sintomas radiculares quando na presença do patógeno. A influência da temperatura no crescimento miceliano e patogenicidade de *P. dissotocum* em plântulas de alface também foi observada em testes *in vitro* realizados por BAPTISTA (2007). Em testes *in vivo* com plantas de crisântemo cultivadas em hidroponia, LIU et al. (2007) verificaram que o escurecimento das raízes das plantas como consequência da infecção por *P. dissotocum* e *P. aphanidermatum* aumentou na mesma proporção em que a temperatura ambiente aumentou, sendo que essa proporção foi mais evidente e intensa pela última espécie do patógeno empregada. A alta temperatura também foi, aliada à luminosidade, responsável pela ocorrência de doença em plantas de pepino hidropônico, em estudos realizados por OWEN-GOING et al. (2003), com as mesmas espécies de patógenos citadas no trabalho anterior. Patógenos como *P. aphanidermatum*, *P. helicoides* e *P. myriotylum* podem crescer em altas temperaturas e permanecer por um longo tempo em



sistemas hidropônicos, a menos que medidas preventivas sejam tomadas para evitar a contaminação (WATANABE et al., 2008).

No presente trabalho foram testados isolados de rizobactérias isoladas de diferentes culturas (Tabela 1) e o fato de o isolado ter sido obtido de uma cultura e testado em outra completamente diferente não interferiu que esse manifestasse a característica benéfica – como biocontrolador ou promotor de crescimento – como aconteceu com alguns isolados (Ps21A, LP22 e MP1) que foram obtidos, de culturas como algodoeiro, chicória e rúcula hidropônica. Esses resultados estão de acordo com o trabalho realizado por QUEIROZ et al. (2006), que inocularam isolados de *P. fluorescens*, *P. putida*, *Chryseobacterium* sp., *Paenibacillus polymyxa* e *S. indologenes* – obtidos da rizosfera de feijoeiro, cenoura e citros – em sementes de limão “Cravo”. Os autores observaram, *in vitro*, que os isolados colonizaram eficientemente a superfície radicular das plântulas. Esses resultados também corroboram os obtidos por LUCON et al. (2008), que avaliaram a promoção de crescimento e o controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias isoladas de diferentes culturas como citros, repolho, rabanete, alface e ornamentais. Esses autores verificaram que todos os isolados possuíam capacidade de colonizar as plântulas de pepino, além de alguns reduzirem o tombamento de plântulas causado por *Pythium aphanidermatum*.

É preciso mencionar um possível efeito das concentrações das suspensões dos isolados inoculados nas plantas nos experimentos *in vivo* realizados (Tabela 4). Foi utilizada uma única concentração de cada isolado, o que poderia levantar a questão sobre a possibilidade de a concentração das suspensões dos antagonistas ter sido insuficiente para promover o crescimento das plantas. No entanto, alguns trabalhos mostram que a concentração, muitas vezes não é fator limitante. A exemplo disso, CORRÊA (2006) utilizou diversos microrganismos com potencial de promoção do crescimento de plantas. Dentre esses testou as concentrações  $10^3$  até  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de um isolado de *Trichoderma* e 0,1, 1 e 10% de meio de cultura fermentado por *Bacillus subtilis*. A autora observou que entre as concentrações  $10^3$  e  $10^6$  não houve promoção de crescimento das plantas e que a concentração  $10^7$  comprometeu o desenvolvimento das plantas. Efeito semelhante foi observado para o isolado de *Bacillus* na concentração de 10%, mas a concentração de 1% do meio fermentado promoveu crescimento das plantas de alface cultivadas em hidroponia. BAPTISTA (2007) também realizou testes, *in vitro* com produto formulado a base de *Trichoderma* e verificou que todas as concentrações testadas (0,1; 0,2 e 0,3mL/L) foram eficientes no

controle do patógeno. Nos testes *in vivo* realizados pelo mesmo autor, esse antagonista promoveu o crescimento das raízes das plantas de alface hidropônica.

Ao se avaliar a severidade da doença, por meio das notas atribuídas às raízes, poderiam surgir dúvidas se o patógeno estava realmente presente na solução nutritiva (Tabela 6). Porém, no momento de colheita das plantas tratadas com suspensão de zoósporos, fez-se reisolamento a partir de suas raízes e plaqueamento da solução nutritiva e foi constatado que o patógeno estava presente. A partir disso pode-se aventar a hipótese de que o isolado de *Pythium* utilizado tenha causado infecção subclínica, situação em que sintomas de podridão radicular não são observados nas raízes, como mencionado por STANGHELLINI & KRONLAND (1986), UTKHEDE et al. (2000), TEIXEIRA et al. (2006). Esses últimos autores realizaram isolamento de raízes de plantas com ou sem sintomas de podridão e verificaram a presença de *Pythium* do grupo F e grupo T em raízes que não apresentavam sintomas de podridão.

Neste trabalho foram testados 26 isolados, nos testes *in vivo*, e, desses, 42,3 % interferiram no ciclo de vida do patógeno a ponto de não causar prejuízos, como diminuição da massa de matéria seca, da parte aérea e/ou das raízes das plantas de alface. A promoção de crescimento da parte aérea foi observada para 11 % dos isolados inoculados e apenas um deles teve o mesmo efeito nas raízes das plantas. Um dos fatores que pode ter sido determinante no sucesso dos antagonistas no controle do patógeno é sua época de inoculação, que foi uma semana anterior à de zoósporos. CHATTERTON et al. (2003) pesquisaram a habilidade de um isolado de *Pseudomonas chlororaphis* em controlar a podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e *P. dissotocum* em plantas de pimentão cultivadas em hidroponia. Nesse trabalho as suspensões com o antagonista foram pré-inoculadas 14, 7 e 3 dias em relação à inoculação da suspensão de zoósporos do patógeno, e também no dia em que essa foi inoculada. Os autores verificaram a existência de relação entre a inoculação prévia do antagonista e a do patógeno posteriormente: quanto mais cedo inoculado o antagonista, menor foi o escurecimento das raízes causado pelo patógeno. Os autores citam que mecanismos como antibiose, por meio de produção de fenazinas, competição com o patógeno por exsudatos radiculares ou indução de resistência, tenham sido responsáveis pelo controle do patógeno na planta hospedeira. O presente trabalho verificou que alguns isolados possuem potencial para inoculação em plantas de alface, dependendo das condições a que foram submetidos. A exemplo disso tem-se o isolado LP13, que, em testes *in vitro*, foi prejudicial ao desenvolvimento das plântulas. No entanto, quando

avaliado seu potencial *in vivo*, mostrou-se eficiente no controle biológico do patógeno. Outros isolados, como MP1 e Ps21A, desenvolveram o mesmo benefício às plantas tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo*. Esses isolados possuem potencial para diminuir os efeitos deletérios causados pelo patógeno principalmente nas raízes: além disso, o isolado MP1 também promoveu crescimento da parte aérea das plantas cultivadas em sistema hidropônico.

O efeito da temperatura, nos experimentos *in vivo*, foi determinante na ocorrência da doença e observou-se que patógenos como *Pythium* podem causar danos irreversíveis à cultura. Evidentemente, a prevenção da introdução do patógeno e a manutenção da limpeza são fatores importantes para diminuir as chances do patógeno se instalar no sistema hidropônico. Aliado a esses cuidados, a inoculação prévia de rizobactérias, como as utilizadas neste trabalho, pode trazer benefícios ao produtor como o controle de *Pythium* no sistema, pois pode reduzir ou até evitar danos causados por esse patógeno; além disso, a utilização de alguns isolados com potencial para promoção de crescimento pode ser um manejo muito rentável ao produtor, pois muitas vezes o benefício gerado é a antecipação da colheita em 2 ou 3 dias, o que, ao longo de um ano, pode representar ganho pelo menos para o produtor de mudas.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) Isolados de rizobactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. possuem potencial para controle biológico de *Pythium* e promoção de crescimento em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico.
- b) Constatou-se correspondência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, abrindo a possibilidade de utilizar os métodos *in vitro* para uma avaliação mais expedita da interação de *Pythium* e de rizobactérias.

## 7 REFERÊNCIAS

ABREU, C.A.; LOPES, A.S.; SANTOS, G. Micronutrientes. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H. V.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. Fertilidade do solo. VIÇOSA – MG, 2007, 1017p.

ALVES, L.F.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; AUGUSTO, N. T. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes temperaturas. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 21-26, 2001.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.

BAPTISTA, F.R. *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface (*Lactuca sativa* L.): avaliação patogênica e controle biológico. 2007. 100f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

BERNARDES, F.S. Rizobactérias na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos. 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MICHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia**, v. 56, n. 2, p. 281-287, 1997.

BROWN, A.E. Activity of glucanases of *Zygorrhynchus moelleri* in relation to antagonism against some soil-borne plant pathogenic fungi. **Journal of Phytopathology**, v. 120, p. 298-309, 1987.

CARDOSO FILHO, J.A.C.; MINHONI, M.T.A. Interações microbianas e controle de fitopatógenos na rizosfera. In: SILVEIRA, A.P.D. & FREITAS, S.S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007, 312p.

CARISSE, O.; BERNIER, J.; BENHAMOU, N. Selection of biological agents from composts for control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, p. 258-267, 2003.

CARVALHO, A.S.; BACH E.E. Extrato de folhas de primavera induz resistência em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokinia*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, (supl.), p. 112-117, 2004.

CHATTERTON, S.; SUTTON, J.C.; BOLAND, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. **Biological Control**, v. 30, n. 2, p. 360-373, 2004.

CIPRIANO, M.A.P.; SANTOS, A.S.; PATRÍCIO, F.R.A.; FREITAS, R.P.; PIRES-ZOTARELLI, C.L.A. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium aphanidermatum* em sistemas hidropônicos. In: Anais do 3º Congresso de iniciação científica em ciências agrárias, biológicas e ambientais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 24-24, 2005.

COELHO, L.F. Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas.

CORRÊA, E.B. Controle da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento em alface hidropônica. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

ECCB – EMPRESA CAXIENSE DE CONTROLE BIOLÓGICO, <http://www.eccb.com.br/index.php>, (17 janeiro 2009).

FREITAS, S.S.; MELLO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n.1, p. 61-70. 2003.

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

FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D. & FREITAS, S. S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007, 312p.

FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIN, V. Cultivo hidropônico de plantas. Boletim Técnico 180, IAC, Campinas, 52p, 1999.

GOMES, A.M.A.; MARINO, R.L.R.; SILVERIA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 699-703, 2003.

GRAVEL, V.; MARTINEZ, C.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. **Biocontrol**, v. 50, p. 771-786, 2005.

GOLD, S.E.; STANGHELLINI, M.E. Effects of temperature on *Pythium* root rot of spinach grown under hydroponic conditions. **Ecology and Epidemiology**, v. 75, p. 333-337, 1985.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. **Nature Reviews Microbiology**. AOP, published online, 2005.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; JÚNIOR, J.R.V.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1247-1252, 2006.

HUNGRIA, M.; URQUIAGA, S. Transformações microbianas de outros elementos. a In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992, 360p.

IDRIS, H.A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. **Biological Control**, v. 45, p. 72-84, 2008.

JAYARAJ, J.; PARTHASARATHI, T.; RADHAKRISHNAN, N.V. Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off. **Biocontrol**, v. 52, p. 683-702, 2007.

JOSHI, F.R.; KHOLIYA, S.P.; ARCHANA, G.; DESAI, A.J. Siderophore cross-utilization amongst nodule isolates of the cowpea miscellany group and its effect on plant growth in the presence of antagonistic organisms. **Microbiological Research**, v. 163, p. 564-570, 2008.

KHAN, A.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and Root Rot in Peppers Grown in Small-scale Hydroponic Troughs. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 6, p. 615-630, 2003.

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

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.L.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends Biotechnology**, v. 7, p. 39-44, 1989.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; FILHO, J.A.C.; PORTZ, R.L.; OSSWALD, W. Indução de resistência em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. *Indução de Resistência Sistêmica em Plantas*, v.14, p.251-285, 2006.

LOPES, M.C.; FREIER, M.; MATTE, J.D.; GARTNER, M.; FRANZENER, G.; CASIMIRO, E.N.; SEVIGNANI, A. Acúmulo de nutrientes por cultivares de alface em cultivo hidropônico no inverno. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 211-215, 2003.

LOPES, A.C.; CARRIJO, O.A.; MAKISHIMA, N. Contaminação com patógenos em sistemas hidropônicos: como aparecem e como evitar. *Comunicado Técnico 31*. Brasília, 2005.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008.

LUZ, J.M.Q.; GUIMARÃES, S.T.M.R.; KORNDÖRFER, G.H. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 295-300, 2006.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de patologia de Plantas**, v. 4, p. 01-49, 1996.

LIU, W.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. **Phytoparasitica**, v. 35, n. 2, p. 159-178, 2007.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MATTHIJS, S.; TEHRANI, K.A.; LAUS, G.; JACKSON, R.W.; COOPER, R.M.; CORNELIS, P. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 425-434, 2007.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, 488p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729p.

MOULIN, F.; LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Suppression of *Pythium* root rot of cucumber by a fluorescent *Pseudomonad* is related to reduced root colonization by *Pythium aphanidermatum*. **Journal of Phytopathology**, v.144, p. 125-129, 1996.

MÜLLER, H.; BERG, G. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. **Biocontrol**, n. 53, p. 905-916, 2008.

OHSE, S.; DOURADO-NETO, D.; MANFRON, P.A.; SANTOS, O.S. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 181-185, 2001.

OWEN-GOING, N.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, n. 2, p. 155-167, 2003.

PATRÍCIO, F.R.A.; KIMATI, H.; NETO, J.T.; PETENATTI, A.; BARROS, B.C. Efeito da solarização de solo, seguida pela aplicação de *Trichoderma* spp. ou de fungicidas, sobre o controle de *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani* AG-4. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 142-146, 2007.

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

PERELLÓ, A.E.; MORENO, M.V.; MÓNACO, C.; SIMÓN, M.R.; CORDO, C. Biological control of *Septoria tritici* Bloch in wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. **BioControl**, v. 54, p. 113-122, 2009.

POSTMA, J.; WILLEMSSEN-DE KLEIN, M.J.E.I.M.; van ELSAS, J.D. Effect of the indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. **Phytopathology**, v. 90, n. 2, p. 125-133, 2000.

QUALIFERTIL – Insumos agropecuário, <http://www.qualifertil.com.br/produtos.php>, (17 janeiro 2009).

QUEIROZ, B.P.V.; AGUILAR-VILDOSO, C.; MELO, I.S. Visualização *in vitro* da colonização por rizobactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 95-97, 2006.

RAHIMIAN, M.K.; BANIHASHEMI, Z. A method for obtaining zoospores of *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucurbit seedling resistance to damping-off. **Plant Disease Reporter**, v. 63, n. 8, p. 658-661, 1979.

RODRIGUES, L.R.F. Técnicas de Cultivo Hidropônico e de Controle Ambiental no Manejo de Pragas, Doenças e Nutrição Vegetal em Ambiente Protegido. Jaboticabal: Unesp, 762p, 2002.

ROMEIRO, R.S. Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. Viçosa: Editora UFV, 2007, 269p.

SANTANA, L.R.R.; CARVALHO, R.D.S.; LEITE, C.C.; ALCÂNTARA, L.M.; OLIVEIRA, T.W.; RODRIGUES, B.M. Qualidade física, microbiológica e paratológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 2, p. 264-269, 2006.

SILVA, J.R.C.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv



*tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e agrotecnologia*, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008a.

SILVA, H.S.A.; TERRASAN, C.R.F.; TOZZI, J.P.L.; MELO, I.S.; BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n.1, p. 49-54, 2008b.

SOTTERO, A.N. Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico, Campinas.

SOUSA, A.L.P.O.; PINTO, Z.V.; CIPRIANO, M.A.P.; SANTOS, A.S.; YAÑEZ, L.D.T.; PATRÍCIO, F.R.A. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium helicoides* em sistemas hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 95-95, 2005.

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 1, p. 50-55, 2008.

SUTTON, J.C.; SOPHER, C.R.; OWEN-GOING, T.N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J.C.; BENCHIMOL, R.L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopatologica**, v. 32, n. 4, p. 307-321, 2006.

STANGHELLINI, M.E.; STOWELL, L.J.; BATES, M.L. Control of root rot of spinach caused by *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system by ultraviolet irradiation. **Plant Disease**, v. 68, n. 12, p. 1075-1076, 1984.

STANGHELLINI, M.E.; KRONLAND, W.C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, v. 70, n.11, p. 1053-56, 1986.

TEIXEIRA, L.D.; ZOTTARELLI, C.L.A.; KIMATI, H. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 221-226, 2006.

VANACHTER, A.; LEUVEN, K.U. Development of *Olpidium* and *Pythium* in the nutrient solutions of NFT grown lettuce, and possible control methods. **Acta Horticulturae** 382, p. 187-196, 1995.

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.

WATANABE, W.; KAGEYAMA, K.; TAGUCHI, Y.; HORINOUCI, H.; HYAKUMACHI, M. Bait method to detect *Pythium* species that grow at high temperatures in hydroponic solutions. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 417-424, 2008.

WALSH U.F.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 289-295, 2001.

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

ZHANG, W.; TU, J.C. Effect of ultraviolet disinfection of hydroponic solutions on *Pythium* root rot and non-target bacteria. **European Journal of Plant Pathology** 106, p. 415-421, 2000.

ZHENG, J.; SUTTON, J.C.; YU, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum* root, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 22, p. 368-379, 2000.

ZHAO, Z.; KUSAKARI, S.; MIYAZAKA, A.; OSAKA, T. Control of *Pythium* root rot on hydroponically growth cucumbers with silver-coated cloth. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 64, n. 7, p. 1515-1518, 2000.

ZHOU, T.; PAULITZ, T.C. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane-treated cucumber roots. **Phytopathology**, v. 83, p. 872-876, 1993.

YANES, 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. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)